

## PATENT ABSTRACTS OF JAPAN

(11)Publication number : 05-184370

(43)Date of publication of application : 27.07.1993

(51)Int.Cl.

C12N 15/53

C12N 15/79

(21)Application number : 04-024439

(71)Applicant : KIRIN BREWERY CO LTD

(22)Date of filing : 14.01.1992

(72)Inventor : TOKURI TOSHIHIRO

UMEKI NAOYUKI

KOBAYASHI OSAMU

## (54) FLAVONOID HYDROXYLASE GENE

## (57)Abstract:

PURPOSE: To provide a genetic manipulation technique capable of introducing hydroxyl group even to the 5'-site of a flavonoid of an ornamental garden flower such as rose and chrysanthemum and preparing a new variety having unique color which is impossible to produce by combination breeding.

CONSTITUTION: A DNA chain coding a protein having a flavonoid 3',5'-hydroxylase activity or arbitrary fragment of the DNA chain. A recombinant vector containing the DNA chain or its arbitrary fragment. Introduction of the DNA chain into a plant free from delphinidin such as rose, chrysanthemum, fringed pink and tulip by conventional introduction method is remarkably effective for increasing the variety of the color such as flower color of the plant, especially for creating a blue-colored flower.

## LEGAL STATUS

[Date of request for examination]

[Date of sending the examiner's decision of rejection]

[Kind of final disposal of application other than the examiner's decision of rejection or application converted registration]

[Date of final disposal for application]

[Patent number]

[Date of registration]

[Number of appeal against examiner's decision of rejection]

[Date of requesting appeal against examiner's decision of rejection]

[Date of extinction of right]

BEST AVAILABLE COPY

Copyright (C); 1998,2003 Japan Patent Office

**\* NOTICES \***

JPO and NCIPi are not responsible for any damages caused by the use of this translation.

- 1.This document has been translated by computer. So the translation may not reflect the original precisely.
- 2.\*\*\*\* shows the word which can not be translated.
- 3.In the drawings, any words are not translated.

---

**CLAIMS**

---

[Claim(s)]

[Claim 1] Flavonoid 3', 5' – The DNA strand which is carrying out the code of the protein with hydroxylase activity, or fragment of the arbitration of this DNA strand.

[Claim 2] Flavonoid 3', 5' – The DNA strand according to claim 1 which is protein originating in the vegetation to which protein with hydroxylase activity belongs to the Solanum (Solanum) group, or fragment of the arbitration.

[Claim 3] Flavonoid 3', 5' – The DNA strand according to claim 1 whose amino acid sequence of protein with hydroxylase activity is what is substantially shown in the array number 1, or fragment of the arbitration.

[Claim 4] The recombination vector containing the DNA strand of claim 1-3 given in any 1 term, or the fragment of the arbitration.

---

[Translation done.]

**\* NOTICES \***

JPO and NCIP1 are not responsible for any damages caused by the use of this translation.

- 1.This document has been translated by computer. So the translation may not reflect the original precisely.
- 2.\*\*\*\* shows the word which can not be translated.
- 3.In the drawings, any words are not translated.

---

**DETAILED DESCRIPTION**

---

[Detailed Description of the Invention]

[0001] [Background of the Invention]

[Industrial Application] This invention is flavonoid which is one of the enzymes which embellish the flavonoid which are main coloring matter which exists in a vegetable petal etc. 3', 5' - It is related with the DNA strand which carries out the code of the hydroxylase.

[0002]

[Description of the Prior Art] Colors, such as vegetable flower, stem, etc., are brought about with the coloring matter which vegetation produces. Like common knowledge, the need of vegetation with new flower, stem, and leaf color is large. There was no other way but to use [ of vegetation, such as a flowering plant which has new color until now ]. however, the goodness of the affinity in connection with mating depending on the combination of various vegetable kinds which use such a classic plant breeding method for a crossbreed, or those stocks and the purpose — a characteristic — inherent in many problems — the characteristic which except does not desire is introduced. Although flavonoid, a carotinoid, and three kinds of coloring matter compounds of betalain mainly give various kinds of color tones to vegetation, flavonoid ( drawing 1 ) is distributed most importantly and widely [ again ]. In a flavonoid compound, various anthocyanin compounds take the lead in a vegetable color tone manifestation, and, as for these compounds, the color tone of yellow, red, and the large range crossed purple and blue can be given from orange. An anthocyanin is the glycoside which sugar combined and calls the part (aglycon) except the sugar an anthocyanidin. Although ten or more sorts of anthocyanidins are known, the main things are three, a pelargonidin, cyanidin, and delphinidin. Although the color tone of anthocyanin coloring matter is decided by structure of an anthocyanidin, especially the large thing of effect is hydroxylation of a flavonoid frame. the delphinidin which hydroxylated all at least for the 3', 4', and 5' in said three main anthocyanidins carried out (refer to drawing 1 on B ring) — purple - although it is blue coloring matter, the pelargonidins which hydroxylated the chisel at least for 4' are pink - orange, and the cyanidin which hydroxylated at least 3' and 4' is red coloring matter. Although a pelargonidin and cyanidin have vegetation, such as a certain kind of vegetation (Rosa), for example, the Rosa, Chrysanthemum (Chrysanthemum), a pink group (Dianthus), and a tulip group (Tulipa), it cannot compound delphinidin. Therefore, the flower of purple - blue does not exist in these vegetable kinds. although the hydroxyl group like 4' is a thing originating in 4-coumaric acid which is the precursor of a flavonoid compound among the hydroxyl groups of B ring of an anthocyanidin — 3' and 5' — the hydroxyl group of an about is introduced after a flavonoid frame is made ( drawing 2 ). Therefore, it turns out that the important (key) enzyme reaction in delphinidin composition is a hydroxylation reaction like 5'. That is, at least 5' cannot be hydroxylated although a rose and a chrysanthemum can hydroxylate at least 3' of flavonoid. For lack of hydroxylation ability, at least 5' of such flavonoid is the enzyme with which the catalyst of this reaction is carried out, i.e., flavonoid. 3', 5' - It is because that vegetable kind lacks hereditarily hydroxylase (F3', 5' H) ( drawing 2 ). For example, since the form which had the enzyme which introduces a hydroxyl group into 5' of flavonoid in the rose does not exist, it is thought that it is very difficult to create a blue rose by the conventional mating breeding method [Forkmann, G., Plant Breeding, 106, 1-26 (1991)]. One

solution over this is screening the individual which makes many variants by mutation processing and is made into the purpose from the inside. however, the thing for which a great burden is placed physically [ performing such actuation with the crops of arbors, such as a rose, ], or in time — clear — moreover — general — the purpose — a characteristic — possibility that variation will arise to the part of an except is also high. on the other hand, versatility is useful for vegetation by development of vegetable gene engineering in recent years using the transgenic technique — it is becoming possible to give a characteristic. Since it does not depend for the gene recombination technique on mating, with the target vegetation, it has the vegetation which cannot be crossed, and the advantage that a gene can be further introduced from a microorganism, an animal, etc. For example, petunia (*Petunia hybrida*) Dihydroflavonol — 4 — Since dihydrokaempferol is not made as for reductase (DFR) to a substrate, a petunia with a pelargonidin is not obtained in a mating breeding (refer to drawing 2 ). then, Mayer (Meyer) \*\* — [— the petunia variant in which dihydrokaempferol accumulates Nature, 330, and 677-678 (1987); JP,2-2305,A] — gene recombination — large corn (*Zea mays*) of substrate selectivity By introducing the DFR gene of the origin and making it discovered, the petunia with the flower color of a new brick color was created. being such — technique — using — if — flavonoid — five — ' — about — it can hydroxylate — an enzyme — namely, — F — three — ' — five — ' — H — a gene — a rose — a chrysanthemum — introducing — being discovered — making — delphinidin — a system — blue — coloring matter — having had — a rose — a chrysanthemum — it may be able to create . However, about F3' and the DNA strand which carries out the code of the 5' H gene, i.e., F3', and 5' H, it was hardly known until now. It is unstated in any way also about the detail of that acquisition approach as well as the base sequence of the DNA strand acquired by this report although there was the latest report [the Nikkei biotechnology theque, 238 number, and August 26, 1991 issue] very much of having acquired slightly the gene which carries out the code of this enzyme from the petunia, or physical properties. now, 5' of the above-mentioned flavonoid and 3' — the hydroxylase which carries out the catalyst of the hydroxylation reaction of an about — biochemical — it can also creep — citchrome P-450 [Forkmann, G., Plant Breeding, 106, and 1-26] (1991) which are the monooxygenase (henceforth a P-450 mold enzyme) of a mold. however, about a vegetable P-450 mold enzyme There is almost no example of research on the structure of a gene also about the hydroxylase to other matter as well as the hydroxylase of flavonoid. Exist in the fruits of an avocado slightly. One-kind cloning of the gene with unknown natural substrate and function of enzyme protein which carry out a code is carried out [Bozak, KR.et al., Proc.Natl.Acad.Sci., 87, and 3904-3908] (1990). As mentioned above, flavonoid 3', 5' — It was impossible in the Prior art to have created the form which operated the hydroxylase gene and had various new colors by flowering plants, such as a chrysanthemum and a rose.

[0003]

[Problem(s) to be Solved by the Invention] This invention gives the capacity which introduces a hydroxyl group also into 5' of flavonoid to the vegetation for admiration of a rose, a chrysanthemum, etc. using the genetic manipulation technique, and, thereby, aims at creating the new plant variety of these vegetation with impossible new color by the crossbreed.

[0004]

[Means for Solving the Problem]

At [outline of invention] this invention, it is flavonoid. 3', 5' — The fragment of the DNA strand which is carrying out the code of the protein with hydroxylase activity, or the arbitration of this DNA strand is offered. A form with new color can be created by introducing this DNA strand into the purpose vegetation. Moreover, this invention relates also to the recombination vector containing the fragment of the above-mentioned DNA strand or the arbitration of this DNA strand.

[0005] [Detailed description]

(1) \*\* Important point (i) The flavonoid hydroxylase gene by flavonoid hydroxylase gene this invention is flavonoid. 3', 5' — It just described above that it was the DNA strand which carries out the code of the protein which has hydroxylase (F3', 5' H) activity, and this desirable mode is the fragment of the DNA strand which is protein originating in the vegetation to which the

above-mentioned protein belongs to the Solanum (Solanum) group, for example, an eggplant etc., or the arbitration of this DNA strand. It is F3' of this invention, and the part of the DNA strand which is a 5' H gene, the protein or the polypeptide a code is carried out [ a polypeptide ] by this partial DNA strand is the form of the fragment of other independent or related enzymes, or fusant with a part, and "the fragment of arbitration" in this invention means F3' and a DNA strand which has 5' H activity as explained in full detail by the term of after-mentioned (6). The DNA strand of this invention includes the degeneracy isomer of each codon to the same amino acid so that it may mention later. The concrete desirable example of this invention gene is the fragment of F3', the DNA strand whose amino acid sequence of the protein which has 5' H activity is what is substantially shown in the array number 1, or the arbitration of this DNA strand. The protein or the polypeptide by which a code is carried out shows F3' and that there may be a permutation, a deficit, addition, etc. about some of amino acid, as long as it has 5' H activity, and also includes the base sequence corresponding to change of this amino acid in this invention DNA strand therefore here as "what an amino acid sequence shows substantially to the array number 1" is explained in full detail by the term of after-mentioned (6). Moreover, in order to make the protein or the polypeptide in which is made to discover this DNA strand and it carries out a code produce, the expression control arrays (promotor of the upstream etc.) other than the DNA array (coding region) corresponding to the amino acid sequence of that polypeptide are required. Therefore, this invention DNA strand also includes a DNA array including this expression control array.

(ii) — preparation of a flavonoid hydroxylase gene — the flavonoid hydroxylase gene by above this inventions the seed of the vegetation (for example, eggplant etc.) which has delphinidin composition ability — a long wave, after growing under merit's optical exposure (preferably red light) It grows under the optical exposure containing short wavelength (preferably the white light and ultraviolet radiation), and is flavonoid. 3', 5' — The manifestation of the gene (mRNA) which carries out the code of the protein which has hydroxylase activity is guided alternatively. Subsequently, it is acquirable by producing cDNA more nearly complementary than this plant body for a mRNA gene being isolated. Moreover, according to the approach of this this invention, the enzyme gene which participates in flavonoid composition can be prepared more easily than before (it mentions later for details). Hereafter, an example is shown and this invention is further explained to a detail.

[0006] (2) The induction approach flavonoid of flavonoid composition 3', 5' — Although hydroxylase (F3', 5' H) is film binding protein, since it will deactivate if it is solubilized to a top with few contents, it is not refined at all until now [Forkmann, G., Plant Breeding, 106, and 1-26] (1991). With the natural thing, F3' and the antibody to 5' H are not obtained, either, and there is no information also about the amino acid sequence of this enzyme. Therefore, F3' and in order to acquire a 5' H gene, development of the system which can carry out cloning of the gene, without refining protein is indispensable. One of the clearest approaches that it is applicable to a higher plant in such a cloning approach is the approach of selecting the gene to which the ingredient with which delphinidin composition is guided on some conditions is made into a gene source, and a manifestation is guided in parallel with induction of delphinidin composition. Generally this approach is called differential hybridization and some examples of a success are reported [Sambrook et al., "Molecular Cloning and second edition", pp.10.38-10.43, Cold Spring Harbor Laboratory Press, and New York (1989)]. In order to make differential hybridization successful, in the organization before induction, it is important that the target gene is not discovered or the amount of manifestations being very low and the gene expression induction which in other words is made into the purpose are clearly controlled compared with the induction back. Comparing the bud young under natural conditions as a system with which the flavonoid composition containing delphinidin is guided with the bud which matured is performed. However, although flavonoid composition system gene expression differed for every developmental stage of a bud to be sure, it was thought not much greatly by the difference ("level" of induction) that the screening by differential hybridization was difficult (the example in the case of the flower of a petunia is shown in drawing 7 ). Moreover, although performing differential screening between the organization containing delphinidin and the organization (for example, a petal and a leaf) not containing or

between the form containing delphinidin (for example, petunia) and the form which is not included was also considered, the difference of the gene expression pattern originating in the difference in an organization or the difference in a form was too large, and it was impossible to have detected the target gene as a matter of fact. Then, artificers are eggplants (*Solanum melongena*) as a result of searching for the system to which delphinidin composition is guided clearly first. It found out that composition of the flavonoid which contains delphinidin very clearly was guided by growing a seed for about two weeks under red light, irradiating what mixed white and an ultraviolet light next (it being called the white light below) two days or more, and growing it. Drawing 3 looked at change of the anthocyan (flavonoid) content for after [ a white light exposure ] five days by artificers' approach. It turns out that a flavonoid content increases by about 20 times by white light exposure. Composite induction took place very promptly and has arrived at the one half of maximum in about 48 hours after an exposure. When change of mRNA of a known gene in the meantime is investigated, they are 3' and 5' at the synthetic system of flavonoid coloring matter. Before induction, as for mRNA of the chalcone synthetic enzyme (CHS) and DFR (refer to drawing 2 ) which are located before and after the flavonoid hydroxylation reaction of an about, it turned out that it is undetectable, and it increases gradually and goes from the 7th hour after induction ( drawing 4 ). On the other hand, a phenylalanine ammonia lyase (PAL) and 4-coumaric acid which work for the upstream to the pan of a flavonoid composition system, and are contained in the phenyl pro PANOIDO composition system which is a more general metabolic system: CoA Although the amount of mRNA of a ligase (4-CL) (refer to drawing 2 ) increased by induction, it existed also before induction. for [Ishikura, "vegetable metabolic turnover physiology", pp.162-168, and Morikita Shuppan] reason whose phenyl pro PANOIDO composition system is a reaction not only common to flavonoid but the synthetic system of the more indispensable matter for growth of vegetation like phytoalexin or a lignin, this is also under red light — it is thought that it is because the extent manifestation is carried out. [ (1987) ] Therefore, it is the cinnamic acid which exists in the middle of PAL and 4-CL and is used as P-450 mold hydroxylase in enzymology. 4 - Also about a hydroxylase (C4H) gene, like PAL or a 4-CL gene, clear induction does not start but it is presumed that the amount of manifestations increases to some extent. The gene such induction does not start strongly has low possibility of being selected by the approach of this invention. Choosing the thing about flavonoid as optical affinity from the inside with regards to most genes guided by the actuation moved to under the white light from the dark place by which the object for \*\* is carried out in case vegetation is generally studied biochemically has very bad effectiveness. In the case of the approach of this invention, mRNA of the ribulose-1 which is the typical enzyme of a photosynthesis system, and a 5-2 phosphoric-acid carboxylase oxygenase small subunit hardly changed the amount before and after induction by the white light ( drawing 4 ). That is, by the system using the seedling of the eggplant of this invention, the clone corresponding to mRNA of the gene of the photosynthesis system which exists so much far is efficiently removable from a flavonoid system. Not only an eggplant but induction of the flavonoid composition by this invention can be carried out to the Tokizane student who grew under the white light by the vegetation which accumulates a flavonoid compound, for example, a petunia, corn, etc. Therefore, the induction system of this invention is utilizable in order to carry out cloning of the various flavonoid composition system genes efficiently from these vegetation. In addition, it is since mRNA of CHS and a DFR gene is specifically discovered also in a seedling at a hypocotyl in the case of an eggplant ( drawing 6 ). It is desirable to take out and use only a hypocotyl. The selected ingredient can check by measuring the enzyme activity of F3' and 5' H about F3' and whether 5' H is included. For example, the following approaches can be used. Serva the labeling service by the tritium is requested from New England new KUREA using the dihydroquercetine (DHQ) put on the market from the shrine — 3H-DHQ is obtained. This is made to react with the membrane fraction of the extract of a vegetable ingredient, and vacuum concentration of the product is extracted and carried out with ethyl acetate. A sensitizer is sprayed and fluorography analyzes, after developing this with the thin-layer chromatography (acetic acid: expansion solvent; chloroform : water = 10:9:1) of a cellulose system. Artificers confirmed being detected by the bud of the petunia of a blue system, and the eggplant seedling after a white light

exposure, F3', and 5' H activity, i.e., the activity which changes DHQ into dihydromill cetin, and that this activity was not detected in the eggplant seedling before optical induction by such technique.

[0007] (3) RNA extract from the eggplant hypocotyl to which production induction of the cDNA library where the clone which carries out the code of the gene which participates in flavonoid composition was condensed was applied, and concentration of mRNA from the inside can be performed according to a conventional method. Composition of a double strand cDNA is the established technique, for example, is Stratagene and Pharmacia. What is necessary is just to use the kit put on the market by a shrine, Amersham, and Invitrogen. For example, when the kit of Stratagene is used, a double strand cDNA is compounded according to the usage of a kit, and it is EcoRI. After attaching an adapter, a restriction enzyme XhoI cuts, and well-known means, such as agarose gel electrophoresis, separate the DNA fragment of 1 to 4kB(s) out of the double strand cDNA from which both ends became an adhesive property. subsequently — for example, after EcoRI/XhoI parts, such as lambdaZAP II which Stratagene sells, insert in the lambda phage vector which is easy to carry out cloning, in-vitro packaging (for example, kits, such as G pack II gold of Stratagene sale, can be used) is carried out, and a cDNA library is made. The cell of the arbitration which can increase phage can be used for the host Escherichia coli used for the infection of phage which carried out packaging. In lambdaZAP II, PLK F' is desirable. The method of producing the above libraries is an example, and a cDNA composition kit, an adapter, a vector, etc. can choose a well-known thing suitably. After producing a cDNA library, a clone to be guided according to the white light is selected by making a plaque (plaque) form in a phage clone with host Escherichia coli, imprinting DNA in this plaque to 2 or the nylon membrane of every three sheets according to a well-known approach, respectively, making it hybridize with a respectively separate probe, and comparing it. For example, before applying induction by the white light, mRNA is extracted from a next eggplant, respectively, corresponding cDNA is compounded, a label is carried out by 32P, and it considers as a probe. And although hybridized powerfully [ cDNA of the eggplant origin before induction ], with cDNA of the eggplant origin after induction, the clone corresponding to the gene guided by the white light can be selected by choosing the plaque group which does not react (differential screening). In order to perform still more efficient screening, it is made to react with mRNA which exists in the eggplant before guiding the cDNA probe of the eggplant origin after induction, and the probe which formed mRNA and the hybrid in the eggplant before induction, and became a double strand is removed beforehand (subtracted probe). Removing the probe used as a double strand alternatively \*\* Separation of the single strand cDNA by the phosphate concentration gradient hydroxyapatite column chromatography (for example, Bio-Rad shrine), and a cDNA-mRNA double strand, Or by extracting the nucleic acid which biotin-izes beforehand mRNA originating in the eggplant before \*\* induction, and was made to combine avidin with the biotin on after [ mRNA ] hybridization further, and avidin combined in a phenol layer Only cDNA which was not hybridized can be carried out by collecting to a water layer (for example, the kit of Invitrogen being used) etc. Thus, by performing the screening and differential screening by the obtained subtracted probe in parallel to the nylon film of 3 copies originating in the same plate, the clone which induction required can be obtained in a high precision ( drawing 5 ). If the screening using the same probe is repeated to the clone obtained as mentioned above and it carries out 2 times or more, precision will increase by leaps and bounds and the library subset which is rich in the clone of white light inductivity will be obtained. When this subset was screened with the known genes CHS and DFR, frequency was increasing it to 10 or more times before condensing both of the clones of a gene. That is, even if it screened library 10,000 clone before concentration by CHS and DFR, when the library after concentration was used to having selected only 2 and 0 clone, respectively, 4 and 1 clone was obtained from 1,000 clones, respectively.

[0008] (4) acquisition of the clone which carries out the code of the P-450 mold enzyme — in order to carry out subcloning of the phage clone obtained as mentioned above to a plasmid, generally carry out subcloning to the plasmid (for example, Bluescript) which started Insertion cDNA with the same enzyme as the restriction enzyme used for cloning of a double strand cDNA, and was cut with the same enzyme after refining phage DNA according to a conventional



method. In lambdaZAP II, the plasmid by which direct subcloning was carried out according to a contractor's operating manual can also be obtained. moreover, the primer corresponding to the vector DNA of a cloning site outside in order to obtain Insertion cDNA simple for the purpose for checking magnitude etc. in order to use as a probe or — for example, polymerase chain reaction (PCR) may be performed combining universal and a reverse primer. In this case, the reaction condition of PCR etc. should just follow a contractor's (Cetus shrine) operating manual. The comparison of the cutting pattern by the crossover hybrid assay between clones or the suitable restriction enzyme investigates the interrelation of obtained cDNA, and the cDNA clone considered to correspond to separate mRNA is selected. thus — investigating how the DNA fragment presumed to originate in a separate gene is discovered in a plant body — the hypocotyl of the eggplant before and behind induction, or another vegetation, for example, the flower of a petunia, — since — what is necessary is just to perform Northern analysis according to a conventional method using obtained mRNA by using these cDNA(s) as a probe The base sequence of the clone chosen as mentioned above is analyzed according to a conventional method. The amino acid sequence in which the code was carried out by the base sequence or it which was obtained GENETYX etc., when database analysis software compares with the array of a well-known P-450 mold enzyme One obtained clone is pC152. The amino acid sequence conjectured to carry out the code P-450 mold enzyme [Bozak of the above mentioned avocado fruits, Steroid of KR.et al., Proc.Natl.Acad.Sci., 87, 3904-3908 (1990)], or a fowl 17 alpha - Various P-450 mold enzymes, such as monooxygenase, and significant homology were shown ( drawing 8 ). however, the comparison with the amino acid sequence of those genes to pC152 \*\*\*\* — since it turned out that 5' side is missing — the phage DNA of a cDNA library — mold — carrying out — pC152 PCR which makes a part of local array and the array on a vector the primer of both ends — carrying out — about 400 bp(s) DNA was obtained. It is completely in agreement, both are straddled, and 3'5 of array [ of an edge ] and pC152' edge array of this DNA is 513. 1,542 which carries out the code of the polypeptide of amino acid residue The open reading frame which consists of a base was found out. Therefore, it is thought that plasmid pC152N which combined both and was obtained contains all the structural genes of the protein considered to be this P-450 mold enzyme. Such an overall-length clone is pC152. It is obtained, even if it considers as a probe and rescreens the library itself. The amino acid sequence expected from it in all the base sequences of pC152N by the array table array number 2 is shown in the array number 1.

[0009] (5) Flavonoid 3', 5' - It is the following, and the manifestation pattern of pC152N of \*\*\*\*\* of Hydroxylase cDNA was made and investigated. First, Northern analysis which uses pC152N as a probe was performed to mRNA acquired from the seedling of an eggplant ( drawing 6 ). pC152 About 1,800 to hybridize In it not being detected but being detected for the first time after a white light exposure, and a seedling, carrying out localization to the hypocotyl instead of a cotyledon was shown in the eggplant seedling which mRNA of a base raised under red light. This white light inductivity and hypocotyl localization are the descriptions common to the manifestation pattern of CHS and DFR, as described above to (1) ( drawing 4 , 6). Next, when mRNA is acquired from the bud or leaf of a petunia \*\*\*\* form of the three-stage from which a growth stage differs and Northern analysis is carried out, it is end-crater Mino mRNA to pC152. About 2,000 to hybridize The band of a base was detected ( drawing 7 R> 7). This is pC152 of the eggplant origin also to a petunia. It is shown in the clone that the gene of homologous exists. However, pC152 which exists in this petunia For mRNA of a homologous gene, magnitude differs and pC152 mRNA of an eggplant is the strength of hybridization to pC152. Homology was presumed to be whenever [ middle ]. According to growth stage of a bud, it is max in the middle and the increase and decrease of a pattern were well in agreement with the gene of other flavonoid composition systems, CHS and DFR, and chalcone flavanone isomerase (CFI). pC152N and mRNA to hybridize cannot be detected by the leaf of a petunia, but the organization in which this mRNA produces coloring matter also in a petunia is shown carrying out localization. The protein with which this pC152N clone is carrying out the code of the above manifestation pattern has suggested being concerned with composition of an anthocyanidin strongly. By the way, a petunia is used as a research ingredient genetic for many years, many variants are known and



many variants of the gene which is governing the flower color are also collected [Sink, KC., "Petunia", pp.34-76, Springer-Verlag and Berlin Heidelberg (1984)] and in it. Then, it extracted [ of the flower / end-crater Mink / mRNA ] from the variant which is carrying out deletion of the flavonoid hydroxylation ability, and the wild strain which has a blue flower, and Northern analysis was performed by using pC152N as a probe. It is about 2,000 as described above in the wild strain. Although the band of a base was detected, at F3' and the variant network in which 5' H suffered a loss, it is pC152. mRNA to hybridize was undetectable. It is a cinnamic acid to consider as the P-450 mold enzyme biochemically in the enzyme group which participates in an anthocyanidin composition system. 4 - Hydroxylase (C4H), flavonoid It is three of 3' - hydroxylase (F3'H) and F3', 5' H [Forkmann, G., Plant Breeding, 106, and 1-26] (1991). In this, C4H are the enzyme of an upstream phenyl pro PANOIDO composition system more. As stated to (2), since the gene cluster of a phenyl pro PANOIDO composition system does not require manifestation induction clear by the white light induction system using the eggplant hypocotyl by this invention, its possibility that cloning will be carried out by the gene acquisition approach of this invention is low. Since 5' H deletion mutants are F3' used in the Northern analysis experiment of a petunia variant furthermore described above, and a stock normal about C4H, the P-450 mold enzyme in which pC152N is carrying out the code is not C4H. Moreover, it turns out that this petunia variant is normal also about F3'H. Therefore, it is thought from the above-mentioned result that pC152Ns are F3' and a cDNA clone which carries out the code of the 5' H.

[0010] (6) Join It is as follows when (2) - (5) is summarized more than argument.

\*\* mRNA corresponding to pC152N does not exist before induction, although manifestation induction is strongly carried out to an eggplant hypocotyl by the white light. The pattern of this manifestation induction is the same as CHS, CFI, and DFR of an anthocyanidin composition system, and differs from PAL of a phenyl pro PANOIDO composition system, and 4-CL. Also in the bud of a petunia, mRNA with large molecular weight was detected for a while from the thing of an eggplant corresponding to pC152N. The manifestation of this mRNA became max in the middle of the developmental stage of a bud as well as the anthocyanidin composition system gene expression pattern. Rather than the gene of phenyl pro PANOIDO composition systems, such as PAL and 4-CL, the gene expression format in which pC152N carries out a code as mentioned above is similar to the gene of anthocyanidin composition systems, such as CHS and DFR, and suggests strongly that this gene is a gene of the anthocyanidin composition system instead of C4H.

\*\* pC152N has a base sequence as shown in the array number 2, and the amino acid sequence (array number 1) presumed from there is judged to be the array of the hydroxylase of P-450 typical mold.

\*\* After not being detected by flavonoid F3' and the eggplant hypocotyl which raised the activity of 5' H under red light but applying white light induction, it is detected for the first time. It is not known whether F3'H exists in an eggplant hypocotyl.

\*\* Although C4H and F3'H were normal, mRNA corresponding to pC152N was not detected out of F3' and end-crater Mink mRNA of a petunia variant where 5' H is missing. The gene to which pC152N carries out the code of this suggests strongly F3' and that it is 5' H.

\*\* The above thing to pC152N is flavonoid which is a key enzyme at the time of compounding delphinidin. 3', 5' - It is concluded that the code of the hydroxylase is carried out.

[0011] If many P-450 mold enzymes exist in the nature corresponding to various substrates, [Nebert et al., Ann.Rev.Biochem., 56 and 945-993 (1987)] and those fragments are used or fusion protein is made combining the fragment of a different P-450 mold enzyme, possibility that enzyme activity will change remarkably is shown. For example, N one end 2/3 of P-450P1 which is the P-450 mold enzyme of yeast P-450 LM4 C one end 1/3 When it was made to unite, it was shown that activity increases farther than any of both [Pompon et al., Gene, 83, and 15-24 (1989)]. Moreover, by the oxidation reaction in which a P-450 mold enzyme carries out a catalyst, it is P-450. P-450 corresponding to such a case with a P-450 mold enzyme although an electron is supplied from a reductase in many cases If a reductase is united, it is also known that the activity of a P-450 mold enzyme will increase more than twice [Shibata, et al., DNA Cell Biol.,

9, and 27-36] (1990). therefore, F3' of this invention and 5' — also in the DNA strand which carries out the code of the H, it is independent about the fragment of the arbitration — it is — probably, it will be clear that it can use as a part of DNA strand which carries out the code of the fusion protein. Moreover, since two or more genetic codes (codon) corresponding to one amino acid exist when carrying out the code of the polypeptide with an amino acid sequence with the DNA strand which generally exists, two or more DNA strands corresponding to one amino acid sequence exist (degeneracy isomer). It cannot be overemphasized in the range to which the amino acid sequence of the polypeptide to which it carries out the code of the 5' H also in F3' of this invention and the DNA strand which carries out a code is not changed that the genetic code of arbitration can be used. Furthermore, even if it is the variation polypeptide by which F3', various amino acid substitution, a deficit, addition, and insertion joined the fragment of 5' H or its arbitration, as long as F3' and 5' H activity are held, it can use for the purpose of this invention. this invention — being desirable — voice — like — setting — a code — carrying out — having — " — flavonoid — — three — ' — five — ' — hydroxylase — activity — having — protein — an amino acid sequence — substantial — an array — a number — one — being shown — a thing — it is — " — \*\* — saying — a case — " — substantial — " — \*\* — saying — the vocabulary — this invention — a DNA strand — a nature — existing — F — three — ' — five — ' — H — activity — having — protein — a code — carrying out — a DNA strand — not only — being such — variation — hydroxylase — a polypeptide — a code — carrying out — a DNA strand — including — things — meaning . Moreover, in order to make the protein or the polypeptide in which is made to discover a DNA strand or its fragment, and it carries out a code produce, an expression control array is required in addition to the DNA array (coding region) corresponding to the amino acid sequence. Therefore, this invention DNA strand also includes a DNA array including such an expression control array. Especially important things are the promotor array of the coding region upstream, and a down-stream poly A addition signal sequence in this expression control array. It can use combining suitably the well-known thing by which functioning in vegetation is known as a promotor and a poly A addition signal, for example, cauliflower mosaic virus 35S promotor, the promotor of a nopaline synthesis enzyme, the promotor of a ribulose biphosphate carboxylase / oxygenase small subunit and the poly A addition signal of a nopaline synthesis enzyme, the poly A addition signal of octopine synthetase, etc. When the acquired DNA array is cDNA, F3' and in order to make 5' H discover in a host, it is required for the upstream and the lower stream of a river of cDNA to connect the aforementioned expression control array. When the acquired DNA array is a genome gene, if the expression control array is included in the DNA array, it can also be used as it is. It just described above that this invention was a thing also about the recombination vector containing an above-mentioned DNA strand or its fragment. This recombination vector makes an above-mentioned DNA strand or its fragment connect with a vector, and can use well-known things, such as a plasmid, phage, or cosmid, as a vector. F3' and 5' H are produced in a host by making hosts, such as suitable vegetation (for example, a rose, a chrysanthemum, a pink, CHURIPU, etc.) and microorganism cells (for example, yeast etc.), introduce and discover this recombination vector DNA.

[0012]

[Example] This invention is not limited by these examples, although an example is given below and this invention is further explained to a detail.

Example 1 300 which carried out seeding of the induction eggplant seed (form " new Sadowara eggplant " of a northeast seeds-and-saplings company) of a flavonoid to the vermiculite, and was obtained through the red acrylic board (1mm made in May Van and in thickness) Continuous irradiation of the red light of looks was carried out, and it was grown for two weeks 25 degrees C. Next, it irradiated [ ultraviolet radiation / a fluorescent lamp (they are 6 W/m<sup>2</sup> in the location of Toshiba Corp. and a seedling) and ultraviolet radiation [this condition is called the white light by this invention] / with a white of 8000 luxs / (Toshiba Corp., floor line-20S E, floor line-20SBLB;0.5 W/m<sup>2</sup> ) ] for five days. The distance from a plant body to the light source was 15-25cm. In order to measure an anthocyan content after a white light exposure, it is 0.2 g in scheduled time. 1% of methanol hydrochloric acid extracts a seedling, and it is 540nm. The

absorbance was measured. When the amount of coloring matter on the 5th was made into max, the one half of maximum was already arrived at in the 2nd day ( drawing 3 R> 3). In parallel, according to the approach [Chirgwin, J.M. et al., Biochemistry, 18, and 5294-5299 (1979)] of char GUWIN, the mRNA extract was performed from each part of a seedling, and it imprinted after agarose electrophoresis according to a contractor's description on the nylon film (Hybond N;Amersham) under denaturation containing formaldehyde. Chalcone synthase (CHS) and dihydroflavonol-4 of a petunia petal - Reductase (DFR), And the ribulose-1 of the leaf of tobacco and all the structural genes of a 5-2 phosphoric-acid carboxylase oxygenase small subunit Each well-known base sequence [Koes et al., Gene, 81, and 245-257 (1989) ;Beld et al., Plant Mol.Biol., 13, and 491-502 (1989);Mazur et al., Nucl.Acids Res., 13, and 2373-2386 (1985)] are used. Cloning was carried out by the PCR method. The conditions of PCR are Cetus. Directions of the description of a shrine were followed. Hybridization was performed to the Northern blot of mRNA of an eggplant by using each obtained gene as a probe. 5xSSPE[1xSSPE hybridization A 10mM(s) phosphate buffer solution (pH 7.0), 1mM EDTA, 0.15M NaCl], and 0.2 % SDS, 100 mug/ml The herring sperm DNA and 100 In the liquid which consists of mug/ml yeast RNA, 60 degrees C, 16 hours — carrying out — after that — the film — 2xSSC [— 1xSSC — 0.15M NaCl and 15mM sodium-citrate] — the inside of liquid — a room temperature and 15 minute x2 time — subsequently — 0.1xSSC 60 degrees C was washed twice [ 15 minute x ] in liquid. The result of an autoradiography is shown in drawing 4 .

[0013] Example 2 According to the production example 1 of the cDNA library where the gene which participates in flavonoid composition was condensed, after growing for two weeks under red light, the eggplant seedling to which induction by the white light was applied for 72 hours was used as an ingredient. mRNA is prepared like an example 1 and it is the cDNA composition kit (lambdaZAP II cloning kit) of Stratagene. It used, and the double strand cDNA was compounded according to a contractor's directions for use, cloning was carried out to the EcoRI/XhoI site of lambdaZAP II, and the cDNA library was produced. On the other hand, before applying white light induction, mRNA is extracted from a next eggplant seedling. every — mRNA100ng oligo (dT) of the amount of 60 times After carrying out annealing to a primer 20microM dCTP and 300 muCi 32 P-dCTP (3000 Ci/mmol; Amersham), Each 200 muM dGTP/dATP/dTTP, 20mM DTT, 50 mM Tris-HCl (pH 7.5), 75mM KCl, 3mM MgCl2 It is 1microl under existence. 32P [ as opposed to / make 37 degrees C react with MMLV reverse transcriptase (100U/mul;BRL shrine) for 1 hour, and / each mRNA ] The cDNA probe which carried out the label was produced and it used for differential screening. Moreover, from cDNA after the white light induction which carried out in this way and was created, as it was the following, the subtracted probe was produced. According to directions for use, mRNA of the eggplant seedling origin before white light induction was biotin-ized using the kit of Invitrogen. 32P Induction before mRNA which the amount biotin-ized 20 times the induction back cDNA which carried out the label 0.2 % SDS of 20microl, and 50mM Hepes (pH7.6), 0.5M NaCl, 2mM EDTA, and 50% (V/V) In the liquid [Crowell and D.N. et al., Proc.Natl.Acad.Sci., 87, and 8815-8819] (1990) containing a formamide, 40 degrees C, It was made to hybridize for 40 hours. It is 80microl to this liquid after reaction termination. 50mM Hepes (pH7.6), 0.5M NaCl, and 2mM EDTA And 10microg Streptoavidin (Vector) Mixed liquor is added and it is after a reaction and 100 for 10 minutes at a room temperature. mul It extracted by the phenol / chloroform mixture, the upper layers were collected, and it used as a subtracted probe. According to the conventional method, the phage library wound on the agar medium was moved to the Hybond N nylon film of three sheets. It screened using the cDNA probe or subtracted probe of the back before the white light induction which described these film above, and the electropositive clone was selected. hybridization — 5xSSPE, 0.2 %SDS, and 100 mug/ml herring sperm DNA and 100 mug/ml the inside of the liquid which consists of Yeast RNA — 65 degrees C and 16 hours — carrying out — after that — the film — 2xSSC the inside of liquid — a room temperature and 15 minute x2 time — subsequently — 0.1 xSSC 65 degrees C was washed twice [ 15 minute x ] in liquid. The example of this experimental result was shown in drawing 5 . It turns out that the ratio of a signal noise is high far by using a subtracted probe compared with the case (differential screening) where it compares using the cDNA probe before induction and after induction directly.

[0014] Example 3 By repeating 30,000 clones by the acquisition of a clone and the approach of the structural-analysis example 2 of carrying out the code of the P-450 mold enzyme, and screening, the library subset which consists of the white light inductivity clone of 70 clones was obtained. From the selected phage clone, subcloning of the cDNA fragment was carried out to Plasmid Bluescript according to the directions for use of lambdaZAP II. Duplication of the obtained clones was checked by restriction enzyme mapping and dot hybridization, ten clones were extracted from the clone considered to be independent at random, and the base sequence was analyzed according to the Sanger's method. About the amino acid sequence by which the code was carried out to the open reading frame found out on the acquired base sequence, it is GENETYX. When compared with the well-known protein amino acid sequence database (NBRF-PDB and Rel.27) using database analysis software (software-development company), they are 1 of ten clones, and pC152. 425 by which the code was carried out to the upper open reading frame The polypeptide which consists of amino acid showed 20 sorts of P-450 mold enzymes, or the fragment and homology of those. All the well-known protein which this clone showed the polypeptide which carries out a code, and a certain amount of homology was a P-450 mold enzyme or its fragment. 1 of them, steroid of a fowl 17 alpha - Monooxygenase and pC152 The comparison with the polypeptide by which the code was carried out is shown in drawing 8 . Moreover, this polypeptide showed significant homology to the P-450 mold enzyme [Bozak, KR.et al., Proc.Natl.Acad.Sci., 87, and 3904-3908] (1990) of the above mentioned avocado fruits. It is pC152 so that clearly from drawing 8 . Since it was presumed that the open reading frame found out upwards had imperfect 5' side, it is pC152. PCR was carried out using complementary synthetic oligo DNA and T3 primer for Bluescript sequence (Promega shrine) to a part of base sequence (20 bases of the base number 378 of the base sequence shown in the array number 2 to 397). This synthetic primer array is pC152. 5' edge of the upper cDNA fragment to about 100 bp(s) It is located in a place and the recognition sequence of a restriction enzyme NdeI is included in that interior. Primer each 0.2 The buffer solution (Cetus what was contained in the shrine kit) of muM, phage library DNA100ng, and 10 time concentration, 0.2mM 4dNTPs, 2.5U Ampli Taq Polymerase (Cetus) and 100 In the reaction mixture which consists of the mineral oil of mul, the reaction cycle (95 degrees C (1 minute), 55 degrees C (1 minute), and 72 degrees C (2 minutes)) was performed 25 times. Equivalent chloroform recovered after an extract and a water layer for the product, and ethanol precipitation was performed. About 400 obtained bp(s) pC152 which cut DNA similarly after cutting with restriction enzymes BamHI (a recognition sequence is on Vector Bluescript), and NdeI BamHI Cloning was carried out between the site and the NdeI site. The base sequence of an PCR fragment part is analyzed according to a conventional method, and it is pC152. When the part which overlaps the upper cDNA fragment was compared, both were completely in agreement. Moreover, during the array originating in an PCR fragment, it is pC152. Translation initiation codon whose upper open reading frame and upper reading frame suited (ATG) It was found out. Therefore, it was concluded that plasmid pC152N obtained by doing in this way contained the open reading frame of perfect length. pC152N 513 in which all the upper base sequences of cDNA fragment 1696bp and it carry out a code All the amino acid sequences of the polypeptide of amino acid are shown in the array numbers 2 and 1 of an array table, respectively. Steroid of a fowl 17 alpha - Monooxygenase is 503. It consists of amino acid and the magnitude of the protein by which the code was carried out to pC152N is well in agreement with this.

[0015] example 4 \*\*\*\* of the gene expression pattern by which the code was carried out to pC152N — it is the following, and the manifestation pattern of the protein by which the code was carried out to this pC152N was made and investigated. before applying white light induction, mRNA was extracted from the hypocotyl and avocado fruits of a next eggplant seedling like the example 1, and Northern hybridization was performed by using 3' side fragment (an ApaI site (base number 992 of the array number 2) — 3' whole side; — referred to as pC152-ApaI below) of pC152N as a probe. Hybridization is 5xSSPE, 0.2 %SDS, and 100. mug/ml Herring sperm DNA 100 mug/ml 65 degrees C is performed for 16 hours in the liquid which consists of Yeast RNA. the after that film — 2xSSC the inside of liquid — a room temperature and 15 minute x2 time — subsequently — 0.1 xSSC 65 degrees C was washed twice [ 15 minute x ] in liquid (except [ all ]

having changed the temperature of hybridization and washing suitably, Northern hybridization of the following examples was performed on this condition). A result is shown in drawing 6 a. Only at the eggplant hypocotyl to which white light induction was applied, it is 1.8kb. The strong signal was obtained. Next, mRNA was similarly extracted from the hypocotyl and cotyledon of an eggplant seedling after white light induction, and Northern hybridization was performed by using as a probe CHS and the DFR structural gene of the petunia origin which were obtained in pC152-ApaI or the example 1. When the gene of the conditions as the above that it is the same when pC152-ApaI is used as a probe, and a petunia was used as a probe, the conditions of hybridization lowered temperature to 60 degrees C, and performed it. A result is shown in drawing 6 b. Even when which probe was used, the signal was obtained only by the hypocotyl and it turned out that the protein by which the code was carried out to pC152N, and the manifestation pattern in CHS and the eggplant seedling of DFR are well alike. Furthermore, the petunia form ("a blue star"; SAKARA SEED CORP.) which pickles a blue flower was grown, and the bud was obtained with time. The classification of the growth stage of a bud made [ that whose die length of a bud is about 20% of maximum length ] 80% of thing the anaphase for 40% of thing in the middle the first stage. mRNA is extracted from the bud of each stage, and a young leaf like an example 1. pC152-ApaI or CHS of the petunia petal origin, DFR (example 1) and a chalcone flavanone isomerase (CFI) structural gene (it is made to be the same as that of an example 1) Northern hybridization was performed by using as a probe what carried out clone NINGU by PCR using the well-known base sequence [Tunen et al., EMBO J., 7, and 1257-1263] (1988). When pC152-ApaI was used as a probe and the temperature of hybridization used the gene of 60 degrees C and a petunia as a probe, it was made into 65 degrees C. A result is shown in drawing 7. When pC152-ApaI was used as a probe, the signal of about 2 kbs was obtained in the bud of the petunia of \*\*\*\*. Although the amount of manifestations of these 2kbmRNA(s) changed according to the growth stage of a bud and its amount of manifestations increased most in the middle, the pattern of this change was in agreement with change of the amount of manifestations of CHS, DFR, and CFI. Moreover, these 2kbmRNA(s) were not detected by the leaf of a petunia as well as DFR. In these results, the gene by which the code was carried out to pC152N, and the gene of homologous exist in the petunia of \*\*\*\*, and the manifestation pattern shows that a strong resemblance to CHS, DFR, and a CFI gene is born. From change of the signal reinforcement when changing the temperature of hybridization, the homology of pC152N of a petunia, the gene to hybridize, and the gene by which the code was carried out to pC152N was presumed to be whenever [ middle ]. the last — the wild strain V6 and variants R3 and W39 of a petunia [— the above — the mol (J. N.M.Mol) of the Netherlands Flea (Vrije) university — sale in lots were received from the professor.] and the form used for the above-mentioned experiment — mRNA was extracted from the bud of "a blue star" (SAKARA SEED CORP.), and the eggplant hypocotyl to which white light induction was applied as control like the example 1, and Northern hybridization was performed at 60 degrees C by using pC152-ApaI as a probe. R3 and W39 Each stock is F3' and a variant which suffered a loss in 5' H, although C4H and F3'H are normal. Consequently, they are 1.8kbs like [ in the hypocotyl of an eggplant, and V6 share and "a blue star" (stock with which all produce delphinidin system coloring matter) of a petunia ] each above-mentioned experiment. Or variants R3 and W39 which suffered a loss in F3' and 5' H although the signal of 2kbs was detected pC152N and the signal to hybridize were not detected on a stock. For this result, the gene by which the code is carried out to pC152N is flavonoid. 3', 5' - It is shown that it is a hydroxylase gene.

[0016]

[Effect of the Invention] A key enzyme [ in / by this invention / the biosynthesis of blue coloring matter delphinidins with a main vegetable petal etc. ], flavonoid 3', 5' - The DNA strand which carries out the code of the hydroxylase was offered. For cyanidin or a pelargonidin, vegetation without delphinidin, for example, a rose, a chrysanthemum, a pink, a tulip, etc. are flavonoid although it is compoundable. 3', 5' - Since hydroxylase is lacked, delphinidin is uncompoundable. Therefore, if the DNA strand of this invention is introduced into the purpose vegetation according to a well-known approach, it will be greatly useful to creation of the versatility of colors, such as a flower color, especially the color of a blue system.



[0017]

[Layout Table] array number: — die-length [ of one array ]: — mold [ of 513 arrays ]: — amino acid topology: — class [ of straight chain-like array ]: — protein origin: — living thing name: — eggplant (Solanum melongena) stock name: — new sand Tsuchihara eggplant array Met Val Ile Leu Pro Ser Glu Leu Ile Gly Ala Thr Ile Ile Tyr Ile 1 5 10 15 Ile Val Tyr Ile Ile Ile Gln Lys Leu IleAla Thr Gly Ser Trp Arg 20 25 30 Arg Arg Arg Leu Pro Pro Gly Pro Glu Gly Trp Pro Val Ile Gly Ala 35 40 45 Leu Pro Leu Leu Gly Gly Met Pro His Val Ala Leu Ala Lys Met Ala 50 55 60 Lys Lys Tyr Gly Pro Ile Met Tyr Leu Lys Val Gly Thr Cys Gly Met 65 70 75 80 Val Val Ala SerThr Pro Asn Ala Ala Lys Ala Phe Leu Lys Thr Leu 85 90 95 Asp Ile Asn Phe Ser Asn Arg Pro Pro Asn Ala Gly Ala Thr His Met 100 105 110 Ala Tyr Asn AlaGln Asp Met Val Phe Ala Pro Tyr Gly Pro Arg Trp 115 120 125 Lys Leu Leu Arg Lys Leu Ser Asn Leu His Met Leu Gly Gly Lys Ala 130 135 140 Leu Glu Asn Trp AlaAsn Val Arg AlaAsn Glu Leu Gly His Met Leu 145 150 155 160 Lys Ser Met PheAspAla Ser His ValGly Glu Arg Ile Val Val Ala 165 170175 Asp Met Leu Thr Phe Ala Met Ala Asn Met Ile Gly Gln Val Met Leu 180 185 190 Ser Lys Arg ValPheVal Glu Lys Gly Lys Glu Val Asn Glu Phe Lys 195 200 205 Asn Met Val Val Glu Leu Met Thr Val Ala Gly Tyr Phe Asn Ile Gly 210 215 220 Asp Phe Ile Pro Gln Ile Ala Trp Met Asp Leu Gln Gly Ile Glu Lys 225 230 235 240 Gly Met Lys Lys Leu His Lys LysPhe Asp Asp Leu Leu Thr Lys Met 245 250 255 Phe Glu Glu His GluAla Thr Ser Asn Glu Arg Lys Gly Lys Pro Asp 260 265 270 Phe Leu Asp Phe Ile Met Ala Asn Arg-Asp-Asn-Ser-Glu-Gly-Glu-Arg 275 280 285 Leu Ser Ile Thr Asn Ile Lys Ala Leu-Leu-Leu-Asn-Leu-Phe-Thr-Ala 290 295 300 Gly Thr Asp Thr Ser Ser Ser Val Ile Glu Trp Ala Leu Thr Glu Met 305 310 315 320 Met Lys Asn Pro Thr Ile Phe Lys Lys Ala Gln Gln Glu Met Asp Gln 325 330 335 Ile Ile Gly Lys Asn Arg Arg Phe Ile Glu Ser Asp Ile Pro Asn Leu 340 345 350 Pro Tyr Leu Arg Ala Ile Cys Lys Glu Ala Phe Arg Lys His Pro Ser 355 360 365 Thr Pro Leu Asn Leu Pro Arg Val Ser Ser Asp Ala Cys Thr Ile Asp 370 375 380 Gly Tyr Tyr Ile Pro Lys Asn Thr Arg Leu Ser Val Asn Ile Trp Ala 385 390 395 400 Ile Gly Arg Asp Pro Asp Val Trp Glu Asn Pro Leu Glu Phe Ile Pro 405 410 415 Glu Arg Phe Leu Ser Glu Lys Asn Ala Lys Ile Glu His Arg Gly Asn 420 425 430 Asp Phe Glu Leu Ile Pro Phe Gly Ala Gly Arg Arg Ile Cys Ala Gly 435 440 445 Thr Arg Met Gly Ile Val Met Val Glu Tyr Ile Leu Gly Thr Leu Ile 450 455 460 His Ser Phe Asp Trp Lys Leu Pro Asn Asp Val Val Asp Ile Asn Met 465 470 475 480 Glu Glu Thr Phe Gly Leu Ala Leu Gln Lys Ala Val Pro Leu Glu Ala 485 490 495 Ile Val Thr Pro Arg Leu Ser Phe Asp Ile Tyr Gln Ser Ser Glu Pro 500 505 510 Phe [0018] array number: — die-length [ of two arrays ]: — mold [ of 1696 arrays ]: — number [ of nucleic-acid chains ]: — double strand topology: — class [ of straight chain-like array ]: — cDNA to mRNA origin: — living thing name: — eggplant (Solanum melongena) stock name: — description [ of a new sand Tsuchihara eggplant array ]: — the description The notation:CDS existence location to express : 49..1590 description

Determined approach :P Array ATAAACTTTA TATTATAATT TATACATTTT TGATATTATT ATATTATCAT GGTTATACTT 60 CCTAGTGAGT TGATTGGAGC AACTATTATA TATATCATAG TATATATTAT TATTCAAAAA 120 TTAATAGCCA CCGGCAGCTG GCGGAGGCGG CGGCTGCCGC CAGGTCCGGA GGGGTGGCCG 180GTGATCGGAG CACTACCACT TTTAGGTGGC ATGCCACATG TTGCACTTGC AAAAATGGCC 240 AAAAAATATG GACCTATTAT GTATTTAAAA GTTGGCACTT GTGGGATGGT TGTTGCTTCA 300 ACTCCTAATG CTGCAAAAGC TTTCTTGAAA ACACTTGATA TTAATTTCTC CAATCGTCCA 360 CCTAATGCAG GTGCCACACA TATGGCCTAT AATGCCCAAG ACATGGTTTT TGCACCCTAT 420 GGACCTCGTT GGAAGTTGCT AAGGAAATTG-AGCAACTTAC ACATGCTAGG-TGGAAAAGCC 480 TTAGAAAATT GGGCCAATGT CCGGGCCAAT-GAGCTAGGTC ACATGCTAAA-ATCGATGTTC 540 GACGCGAGCC ATGTGGGTGA ACGCATAGTC-GTGGCCGATA TGTTGACGTT-CGCGATGGCA 600 AACATGATAG GTCAAGTGAT GTTAAGCAAG AGAGTGTTTCG TCGAAAAAGG TAAAGAGGTC 660 AACGAATTCA AAAATATGGT CGTGGAAGTGT ATGACAGTTG CGGGGTACTT TAATATTGGC 720 GATTTTATTC CTCAAATAGC TTGGATGGAT TTACAAGGAA TTGAAAAGGG GATGAAAAAA 780 TTGCACAAAA AATTTGATGA TTTATTGACA AAAATGTTTG AGGAGCATGA GGCAACTAGC 840 AATGAAAGAA AAGGGAAACC TGATTTTCTT GATTTTATTA TGGCAAATAG GGATAATTCT 900 GAAGGAGAAA GGCTTAGTAT AACAAATATC AAAGCACTTT TACTGAATTT GTTCACAGCT 960 GTACAGACA

CCTCATCTAG CGTGATAGAA TGGGCCCTCA CAGAAATGAT GAAAAATCCC 1020  
ACAATTTTCA AAAAAGCCCA ACAAGAAATG GACCAAATAA TTGGCAAAAA TAGACGTTTT  
1080 ATTGAATCTG ATATCCCAA TCTCCCTTAT TTACGTGCAA TTTGCAAAGA  
AGCATTTTCA 1140 AAACACCCTT CAACGCCACT AAATCTTCCT AGGGTGTCAA  
GTGATGCGTG CACGATCGAT 1200 GGTTACTATA TACCAAAAAA CACTAGGCTC  
AGCGTCAATA TATGGGCGAT TGGACGAGAC 1260 CCTGACGTGT GGGAGAATCC  
TCTCGAATTC ATTCCCGAGA GGTTTTTGAG TGAGAAAAAT 1320 GCAAAGATTG  
AGCATCGAGG AAATGATTTT GAATTGATTC CATTTGGTGC AGGACGAAGA 1380  
ATTTGTGCCG GCACAAGGAT GGAATAGTG ATGGTTGAGT ATATATTGGG AACTTTGATA  
1440 CATTCATTTG ATTGGAAATT ACCAAATGAT GTTGTTGATA TAAATATGGA  
GGAAACTTTT 1500 GGATTAGCTT TGCAAAAAGC TGTCCCTCTT GAAGCTATAG  
TACTCCAAG GCTATCTTTC 1560 GATATTTATC AGTCTAGCGA GCCTTTCTGA  
TCATCTACAT TGTAACGTAT TTGTTGAAGA 1620 CTTTAACAAA AGAAAACTCG  
CTTTATATAT GAAAAACTGA TAATGTCATA TCTCGGAGGA 1680 TTTTATTTTG TAAAAA  
1696

---

[Translation done.]



**\* NOTICES \***

JPO and NCIP are not responsible for any damages caused by the use of this translation.

- 1.This document has been translated by computer. So the translation may not reflect the original precisely.
- 2.\*\*\*\* shows the word which can not be translated.
- 3.In the drawings, any words are not translated.

---

**DESCRIPTION OF DRAWINGS**

---

**[Brief Description of the Drawings]**

[Drawing 1] It is drawing showing the frame of flavonoid.

[Drawing 2] It is the schematic diagram of the reaction of phenyl pro PANOIDO and a flavonoid composition system.

[Drawing 3] It is the explanatory view showing aging of the anthocyanin content in the eggplant seedling after a white light exposure. It is maximum 100 It has expressed with the relative value carried out.

[Drawing 4] It is the electrophoresis photograph which investigated aging of the amount of mRNA (s) of CHS in the eggplant seedling after a white light exposure, DFR and ribulose-1, and a 5-2 phosphoric-acid carboxylase oxygenase small subunit (RuBisCO) by Northern hybridization.

[Drawing 5] It is the photograph in which the example of screening of the clone which carries out the code of the gene in which manifestation induction is carried out by the white light into an eggplant hypocotyl is shown. The result of having screened the library using the probe which carried out subTORAKUTO of the cDNA to mRNA after the differential screening using the cDNA probe to mRNA obtained from the organization before induction and after induction and induction by mRNA before induction of an overlarge is shown. DNA was imprinted in the filter of three sheets from one plate, and it was made to hybridize with each probe. The point of an arrowhead shows the same clone.

[Drawing 6] It is the electrophoresis photograph in which the result of (a) having used pC152N as the probe and having carried out Northern analysis of the eggplant hypocotyl before and behind optical induction and the mRNA of the avocado fruits origin is shown, and (b) and (c) are electrophoresis photographs in which the result of having performed Northern analysis by using CHS, DFR, and pC152N as a probe to mRNA which divided the eggplant seedling into the hypocotyl and the cotyledon and took it is shown.

[Drawing 7] It is the electrophoresis photograph in which the result of having performed Northern analysis to mRNA obtained by using CHS, CFI, DFR, and pC152N as a probe on the end-crater Mika passage-of-time target of a \*\*\*\* petunia form and mRNA obtained from the leaf of the eggplant hypocotyl to which induction was applied about some probes, and a petunia is shown.

[Drawing 8] pC152 About the amino acid sequence of the polypeptide in which the upper open reading frame is carrying out the code, it is the steroid of a fowl. 17 alpha - It is drawing in comparison with the amino acid sequence of monooxygenase (SMO).

**[Description of Notations]**

PAL : phenylalanine ammonia lyase

C4H : Cinnamic acid 4-hydroxylase

4-CL : 4-coumaric acid: CoA ligase

CHS : chalcone synthetic enzyme

CFI : chalcone flavanone isomerase

F3'H : Flavonoid 3'-hydroxylase

F3', 5' H: Flavonoid 3', 5' - Hydroxylase

DFR : dihydroflavonol -4-reductase

(The above relates to drawing 2 )

\* : congruous amino acid

- : similar amino acid

(The above relates to drawing 8 )

---

[Translation done.]

## 全項目

(19)【発行国】日本国特許庁(JP)  
 (12)【公報種別】公開特許公報(A)  
 (11)【公開番号】特開平5-184370  
 (43)【公開日】平成5年(1993)7月27日  
 (54)【発明の名称】フラボノイド水酸化酵素遺伝子  
 (51)【国際特許分類第5版】

C12N 15/53 ZNA  
 15/79

## 【F1】

C12N 15/00 A 8931-4B

【審査請求】未請求

【請求項の数】4

【全頁数】16

(21)【出願番号】特願平4-24439

(22)【出願日】平成4年(1992)1月14日

(71)【出願人】

【識別番号】000253503

【氏名又は名称】麒麟麦酒株式会社

【住所又は居所】東京都渋谷区神宮前6丁目26番1号

(72)【発明者】

【氏名】戸栗敏博

【住所又は居所】栃木県塩谷郡喜連川町大字早乙女字申塚3377 麒麟麦酒株式会社植物開発研究所内

(72)【発明者】

【氏名】梅基直行

【住所又は居所】栃木県塩谷郡喜連川町大字早乙女字申塚3377 麒麟麦酒株式会社植物開発研究所内

(72)【発明者】

【氏名】小林統

【住所又は居所】栃木県塩谷郡喜連川町大字早乙女字申塚3377 麒麟麦酒株式会社植物開発研究所内

(74)【代理人】

【弁理士】

【氏名又は名称】佐藤 一雄 (外2名)

## (57)【要約】

【目的】遺伝子操作手法を用いて、バラ、キク等の観賞用の植物にフラボノイドの5'位にも水酸基を導入する能力を与え、それにより交雑育種では不可能な新規な色彩を持ったこれら植物の新品種を作出する技術を提供する。

【構成】フラボノイド 3',5'-水酸化酵素活性を持つタンパク質をコードしているDNA鎖またはこのDNA鎖の任意の断片。上記のDNA鎖またはその任意の断片を含有している組換えベクター。本発明DNA鎖を、公知の方法に従ってデルフィニジンを持たない植物、たとえばバラ、キク、ナデシコ、チューリップなどに導入すれば、花色等の色彩の多様性、特に、青色系の色彩の創出に大きく役立つ。

## 【特許請求の範囲】

【請求項1】フラボノイド 3',5'- 水酸化酵素活性を持つタンパク質をコードしているDNA鎖またはこのDNA鎖の任意の断片。

【請求項2】フラボノイド 3',5'- 水酸化酵素活性を持つタンパク質がソラナム(*Solanum*)属に属する植物に由来するタンパク質である、請求項1記載のDNA鎖またはその任意の断片。

【請求項3】フラボノイド 3',5'- 水酸化酵素活性を持つタンパク質のアミノ酸配列が実質的に配列番号1に示すものである、請求項1記載のDNA鎖またはその任意の断片。

【請求項4】請求項1～3のいずれか1項記載のDNA鎖またはその任意の断片を含有している組換えベクター。

## 【発明の詳細な説明】

## 【0001】[発明の背景]

【産業上の利用分野】本発明は、植物の花弁等に存在する主要な色素であるフラボノイド系色素を修飾する酵素の一つである、フラボノイド 3',5'- 水酸化酵素をコードするDNA鎖に関するものである。

## 【0002】

【従来の技術】植物の花・茎等の色は、植物が生産する色素によってもたらされる。周知のごとく、新しい花・茎・葉色を持った植物の需要は大きい。これまでは、新しい色彩を有する花卉等の植物の生産には交雑育種を利用するほかにはなかった。しかしながら、このような古典的な植物育種法は、交雑育種に用いる様々な植物種もしくはそれらの株の組合せに依存した交配に関わる相性の良さ、目的形質以外の望まざる形質が導入されることなど多くの問題を内在していた。植物に各種の色調を与えるのは、主としてフラボノイド、カロチノイド、ベタレインの3種類の色素化合物であるが、最も重要でまた広く分布しているのはフラボノイド(図1)である。フラボノイド化合物の中で、植物の色調発現の中心となるのが種々のアントシアニン化合物であり、これらの化合物は橙色から黄、赤、紫、青色に渡る広い範囲の色調を与えることができる。アントシアニンは糖が結合した配糖体であり、その糖を除いた部分(アグリコン)をアントシアニンジンと呼ぶ。10種以上のアントシアニンジンが知られているが、主なものはペラルゴニンジン、シアニンジン、デルフィニンジンの3つである。アントシアニン色素の色調はアントシアニンジンの構造によって決まるが、特に影響の大きいのはフラボノイド骨格の水酸化である。前記した3つの主要なアントシアニンジンの中で、その3', 4', 5'位(B環上、図1参照)すべてが水酸化されたデルフィニンジンは紫～青色の色素であるが、4'位のみが水酸化されたペラルゴニンジンはピンク～橙色であり、3'および4'位が水酸化されたシアニンジンは赤色の色素である。ある種の植物、たとえばバラ属(*Rosa*)、キク属(*Chrysanthemum*)、ナデシコ属(*Dianthus*)、チューリップ属(*Tulipa*)などの植物は、ペラルゴニンジンやシアニンジンは持っているが、デルフィニンジンを合成できない。そのためこれらの植物種には紫～青色の花が存在しない。アントシアニンジンのB環の水酸基のうち、4'位の水酸基はフラボノイド化合物の前駆物質である4-クマル酸に由来するものであるが、3'および5'位の水酸基はフラボノイド骨格ができた後に導入される(図2)。したがってデルフィニンジン合成における重要な(キー)酵素反応は、5'位の水酸化反応であることがわかる。すなわち、バラやキクはフラボノイドの3'位を水酸化することはできるが、5'位を水酸化することができない。このようなフラボノイドの5'位水酸化能の欠如は、この反応を触媒する酵素、すなわちフラボノイド 3',5'- 水酸化酵素(F3',5' H)(図2)がその植物種に遺伝的に欠如しているためである。たとえば、バラにはフラボノイドの5'に水酸基を導入する酵素を持った品種が存在しないので、青色のバラを従来の交配育種法で作出することは極めて困難と考えられている[Forkmann, G., Plant Breeding, 106,1-26, (1991)]。これに対する一つの解決策は、突然変異処理により多数の変異株を作り、その中から目的とする個体をスクリーニングすることである。しかしながら、バラ等の木本の作物でそのような操作を行うことは、物理的あるいは時間的に多大の負担がかかることは明らかであり、また、一般に目的形質以外の部位に変異が生ずる可能性も高い。一方、近年の植物遺伝子工学の発展により、遺伝子組換えの手法を用いて植物に種々の有用形質を与えることが可能になりつつある。遺伝子組換え手法は交配に依存しないので、目的とする植物とは交配できない植物や、さらには微生物、動物などからも遺伝子を導入できるという利点を有している。たとえば、ペチュニア(*Petunia hybrida*)のジヒドロフラボノール-4-レダクターゼ(DFR)はジヒドロケンフェロールを基質にできないため、交配育

種ではペラルゴニンを持つペチュニアが得られない(図2参照)。そこで、マイヤー(Meyer)ら[Nature, 330, 677-678 (1987); 特開平2-2305]は、ジヒドロケンフェロールが蓄積するペチュニア変異体に、遺伝子組換えによって基質選択性の広いトウモロコシ(Zea mays)由来のDFR遺伝子を導入し発現させることにより、新規なレンガ色の花色を持つペチュニアを作成した。このような手法を用いれば、フラボノイドの5'位を水酸化することができる酵素、すなわちF3',5'-Hの遺伝子をバラやキクに導入して発現させ、デルフィニジン系青色色素を持ったバラやキクを作出できる可能性がある。しかしながらこれまでにF3',5'-H遺伝子、すなわちF3',5'-HをコードするDNA鎖についてはほとんど知られていなかった。わずかにペチュニアからこの酵素をコードする遺伝子を取得したというごく最近の報告[日経バイオテク、238号、1991年8月26日発行]があるが、この報告には取得されたDNA鎖の塩基配列や物性はもちろん、その取得方法の詳細についてもなんら記載がない。さて、前述のフラボノイドの5'および3'位の水酸化反応を触媒する水酸化酵素は、生化学的にはいずれもシトクロームP-450型のモノオキシゲナーゼ(以下P-450型酵素という)である[Forkmann, G., Plant Breeding, 106, 1-26 (1991)]。しかしながら、植物のP-450型酵素については、フラボノイドの水酸化酵素はもちろん、他の物質に対する水酸化酵素についても遺伝子の構造上の研究例はほとんどなく、わずかに、アボカドの果実に存在する、コードする酵素タンパク質の天然基質および機能ともに不明な遺伝子が一種類クローニングされているに過ぎない[Bozak, K.R. et al., Proc. Natl. Acad. Sci., 87, 3904-3908 (1990)]。以上のように、フラボノイド3',5'-水酸化酵素遺伝子を操作してキク、バラ等の花卉で種々の新規な色彩を持った品種を作出することは、従来の技術では不可能であった。

【0003】

【発明が解決しようとする課題】本発明は、遺伝子操作手法を用いて、バラ、キク等の観賞用の植物にフラボノイドの5'位にも水酸基を導入する能力を与え、それにより交雑育種では不可能な新規な色彩を持ったこれら植物の新品種を作出することを目的とする。

【0004】

【課題を解決するための手段】

【発明の概要】本発明では、フラボノイド3',5'-水酸化酵素活性を持つタンパク質をコードしているDNA鎖またはこのDNA鎖の任意の断片が提供される。このDNA鎖を目的植物に導入することにより、新しい色彩を有した品種を作出することができる。また本発明は、上記のDNA鎖またはこのDNA鎖の任意の断片を含有している組換えベクターにも関する。

【0005】【発明の詳細な説明】

(1) 概要(i) フラボノイド水酸化酵素遺伝子本発明によるフラボノイド水酸化酵素遺伝子は、フラボノイド3',5'-水酸化酵素(F3',5'-H)活性を有するタンパク質をコードするDNA鎖であることは前記したところであり、この好ましい態様は、上記タンパク質がソラナム(Solanum)属に属する植物、たとえばナスなど、に由来するタンパク質であるDNA鎖またはこのDNA鎖の任意の断片である。本発明における「任意の断片」とは、後記(6)の項で詳述されているように、本発明のF3',5'-H遺伝子であるDNA鎖の部分であって、この部分DNA鎖によってコードされるタンパク質もしくはポリペプチドが、単独でまたは他の関連酵素の断片もしくは部分との融合体の形で、F3',5'-H活性を有するようなDNA鎖を意味する。本発明のDNA鎖は、後述するように同一のアミノ酸に対する各コドンの縮重異性体を包含する。本発明遺伝子の具体的な好ましい例は、F3',5'-H活性を有するタンパク質のアミノ酸配列が実質的に配列番号1に示すものであるDNA鎖またはこのDNA鎖の任意の断片である。ここで「アミノ酸配列が実質的に配列番号1に示すもの」とは、後記(6)の項で詳述されているように、コードされるタンパク質もしくはポリペプチドがF3',5'-H活性を有する限りアミノ酸のいくつかについて置換、欠損、付加などがあってもよいことを示すものであり、従って本発明DNA鎖は、このアミノ酸の変化に対応する塩基配列をも包含する。また、このDNA鎖を発現させてそれがコードするタンパク質もしくはポリペプチドを産生させるためには、そのポリペプチドのアミノ酸配列に対応するDNA配列(コーディング領域)の他に、発現調節配列(上流側のプロモーターなど)が必要である。したがって、本発明DNA鎖は、この発現調節配列を含むDNA配列をも包含するものである。

(ii) フラボノイド水酸化酵素遺伝子の調製上記のような本発明によるフラボノイド水酸化酵素遺伝子は、デルフィニジン合成能を有する植物(たとえばナスなど)の種子を長波長の光照射下(好ましくは赤色光)で栽培した後に、短波長を含む光照射下(好ましくは白色光および紫外光)で栽培してフラボノイド3',5'-水酸化酵素活性を有するタンパク質をコードする遺伝子(mRNA)の発現を選択的に誘導し、次いでこの植物体よりmRNA遺伝子を単離してこれに相補的なcDNAを作製することにより取得できる。また、この本発明の方法によればフラボノイド合成に関与する酵素遺

伝子を従来より容易に調製することができる(詳細は後述)。以下、具体例を示して本発明をさらに詳細に説明する。

【0006】(2)フラボノイド系色素合成の誘導方法フラボノイド 3',5'- 水酸化酵素(F3',5' H)は膜結合タンパク質であるが、含量が少ない上に可溶化すると失活するため、これまで全く精製されていない[Forkmann, G., Plant Breeding, 106, 1-26 (1991)]。当然のことながら、F3',5' Hに対する抗体も得られていないし、この酵素のアミノ酸配列に関しても全く情報がない。したがって、F3',5' H遺伝子を取得するためには、タンパク質の精製を行わずに遺伝子をクローニングできる系の開発が必須である。このようなクローニング方法の中で、高等植物に適用できる最も確かな方法の一つは、ある条件でデルフィニジン合成が誘導される材料を遺伝子源とし、デルフィニジン合成の誘導に平行して発現が誘導される遺伝子を選抜する方法である。この方法は、一般的にはディファレンシャル・ハイブリダイゼーションと呼ばれ、いくつかの成功例が報告されている[Sambrook et al., "Molecular Cloning, second edition", pp. 10.38-10.43, Cold Spring Harbor Laboratory Press, New York (1989)]。ディファレンシャル・ハイブリダイゼーションを成功させるためには、誘導前の組織では目的の遺伝子が発現していないかあるいは誘導後に比べて極めて発現量が低いこと、言い換えれば目的とする遺伝子の発現誘導が明確に制御されていることが重要である。デルフィニジンを含むフラボノイド系色素合成が誘導される系として、自然条件下で若いつぼみと成熟したつぼみとを比較することが行われている。しかしながら、フラボノイド合成系遺伝子の発現は確かにつぼみの発育段階ごとに異なっているが、その差(誘導の「レベル」)はあまり大きくなく、ディファレンシャル・ハイブリダイゼーションによるスクリーニングは困難と考えられた(ペチュニアの花の場合の例を図7に示す)。また、デルフィニジンを含む組織と含まない組織(たとえば花弁と葉)との間、あるいはデルフィニジンを含む(たとえばペチュニア)品種と含まない品種との間でディファレンシャル・スクリーニングを行うことも考えられるが、組織の違い、あるいは品種の違いに由来する遺伝子発現パターンの差が大きすぎて、目的とする遺伝子を検出することが事実上不可能であった。そこで発明者らは、まずデルフィニジン合成が明確に誘導される系を探索した結果、ナス(*Solanum melongena*)の種子を赤色光の下で約2週間栽培し、次に白色と紫外の光を混合したもの(以下では白色光と呼ぶ)を2日以上照射し栽培することにより、非常に明確にデルフィニジンを含むフラボノイドの合成が誘導されることを見いだした。発明者らの方法で白色光照射後5日間のアントシアン(フラボノイド系色素)含量の変化を見たのが図3である。白色光照射によってフラボノイド含量が約20倍に増加することがわかる。合成の誘導は非常に速やかに起こり、照射後約48時間で最大値の半分に達している。この間の既知の遺伝子のmRNAの変化を調べてみると、フラボノイド色素の合成系で3',5'位のフラボノイド水酸化反応の前後に位置するカルコン合成酵素(CHS)およびDFR(図2参照)のmRNAは、誘導前には検出できず、誘導後7時間めから徐々に増えて行くことがわかった(図4)。これに対し、フラボノイド合成系のさらに上流に働き、より一般的な代謝系であるフェニルプロパノイド合成系に含まれるフェニルアラニンアンモニアリアーゼ(PAL)および4-クマル酸:CoA リガーゼ(4-CL)(図2参照)のmRNAは、誘導により量は増えるものの、誘導前にも存在していた。これは、フェニルプロパノイド合成系が、フラボノイドのみならず、ファイトアレキシンやリグニンのような植物の生育にとってより必須な物質の合成系にも共通した反応である[石倉,「植物代謝生理学」, pp. 162-168, 森北出版(1987)]ため、赤色光の下でもある程度発現しているからだと考えられる。従って、PALと4-CLの中間に存在し、酵素学的にはP-450型水酸化酵素とされているケイ皮酸 4- 水酸化酵素(C4H)遺伝子に関しても、PALや4-CL遺伝子同様明確な誘導はかからず、ある程度発現量が増えるに過ぎないと推定される。このような誘導が強くかからない遺伝子は、本発明の方法では選抜される可能性が低い。一般的に植物を生化学的に研究する際に頻用される、暗所から白色光の下へ移す操作では、誘導される遺伝子の大部分が光合性に関係したものであり、その中からフラボノイドに関するものを選ぶことは極めて効率が悪い。本発明の方法の場合、光合成系の代表的な酵素であるリブローズ-1,5- 2リン酸カルボキシラーゼ・オキシゲナーゼ小サブユニットのmRNAは、白色光による誘導の前後でその量がほとんど変わらなかった(図4)。すなわち本発明のナスの実生を使った系では、フラボノイド系よりはるかに多量に存在する光合成系の遺伝子のmRNAに対応するクローンを効率よく除去することができる。本発明によるフラボノイド合成の誘導は、ナスに限らず、白色光下で栽培した時実生にフラボノイド化合物を蓄積する植物、たとえばペチュニア、トウモロコシ等で行うことも可能である。したがって、本発明の誘導系は、これらの植物から種々のフラボノイド合成系遺伝子を効率よくクローニングするために活用することができる。なおナスの場合には、CHSおよびDFR遺伝子のmRNAは実生の中でも胚軸に特異的に発現するので(図6)、胚軸のみを取り出して用いることが望ましい。選んだ材料がF3',5' Hを含むかどうかについては、F3',5' Hの酵素活性を測



ることにより確認できる。たとえば、次のような方法を用いることができる。Serva 社から発売されているジヒドロケルセチン(DHQ)を用いてニューイングランド・ニュークレアー社にトリチウムによるラベリング・サービスを依頼し、 $^3\text{H}$ -DHQを得る。これを、植物材料の抽出液の膜画分と反応させ、その生成物を酢酸エチルで抽出し減圧濃縮する。これをセルロース系の薄層クロマトグラフィー(展開溶媒:クロロホルム:酢酸:水=10:9:1)で展開した後、増感剤を噴霧しフルオログラフィーにより分析する。発明者らは、このような手法により、F3',5' H活性、すなわちDHQをジヒドロミルセチンに変換する活性が、青色系のベチュニアのつぼみおよび白色光照射後のナス実生で検出されること、および光誘導前のナス実生中にはこの活性が検出されないことを確かめた。

【0007】(3)フラボノイド合成に関与する遺伝子をコードするクローンが濃縮されたcDNAライブラリーの作製誘導をかけたナス胚軸からのRNA抽出およびその中からのmRNAの濃縮は常法に従って行うことができる。二本鎖cDNAの合成は確立した技術であり、たとえばStratagene社、Pharmacia 社、Amersham社、Invitrogen社等から発売されているキットを使用すればよい。たとえばStratagene社のキットを用いた場合、キットの使用法に従って二本鎖cDNAを合成し、EcoRI アダプターをつけてから制限酵素XhoIで切断し、両末端が接着性となった二本鎖cDNAの中からアガロースゲル電気泳動等の公知手段によって1から4kBのDNA断片を分離する。ついで、たとえばStratagene社が販売している„ZAP II”などのEcoRI/XhoI部位がクローニングしやすくなっているラムダファージベクターに挿入した後、試験管内パッケージング(たとえばStratagene社販売のギガパックIIゴールドなどのキットを用いることができる)してcDNAライブラリーを作る。パッケージングしたファージの感染に用いる宿主大腸菌には、ファージが増殖できる任意の細胞を使いうる。„ZAP II”の場合には、PLK F'が好ましい。以上のようなライブラリーの作製法は一例であり、cDNA合成キット、アダプター、ベクター等は公知のものを適宜選択できる。cDNAライブラリーを作製した後、ファージクローンに宿主大腸菌で溶菌斑(プラーク)を形成させ、このプラーク中のDNAを、公知の方法にしたがってそれぞれ2または3枚ずつのナイロン・メンブレンへ転写し、それぞれ別個のプローブとハイブリダイズさせて比較することにより、白色光によって誘導される目的のクローンを選抜する。たとえば、白色光による誘導をかける前および後のナスからそれぞれmRNAを抽出し、対応するcDNAを合成して $^{32}\text{P}$ でラベルしてプローブとする。そして、誘導前のナス由来のcDNAとは強力にハイブリダイズするが、誘導後のナス由来のcDNAとは反応しないプラーク群を選ぶことにより、白色光で誘導される遺伝子に対応するクローンを選抜することができる(ディファレンシャル・スクリーニング)。さらに効率のよいスクリーニングを行うためには、誘導後のナス由来のcDNAプローブを誘導前のナスに存在するmRNAと反応させ、誘導前のナス中のmRNAとハイブリッドを形成して二本鎖となったプローブをあらかじめ除去する(サブトラクト・プローブ)。二本鎖となったプローブを選択的に除くのは、■リン酸塩濃度勾配ヒドロキシ・アパタイト・カラム・クロマトグラフィー(たとえばBio-Rad 社)による一本鎖cDNAとcDNA・mRNA二本鎖の分離、あるいは■誘導前のナスに由来するmRNAをあらかじめビオチン化しておき、ハイブリッド形成後mRNA上のビオチンにアビジンをさらに結合させ、アビジンが結合した核酸をフェノール層に抽出することにより、ハイブリダイズしなかったcDNAのみを水層に回収すること(たとえばInvitrogen社のキットを用いることができる)などの方法で実施できる。このようにして得たサブトラクト・プローブによるスクリーニングとディファレンシャル・スクリーニングを同一プレートに由来する3コピーのナイロン膜に対して並行して行うことにより、誘導のかかったクローンを高い精度で得ることができる(図5)。以上のようにして得たクローンに対して同じプローブを用いたスクリーニングを繰り返し2度以上行くと精度が飛躍的に高まり、白色光誘導性のクローンに富むライブラリー・サブセットが得られる。このサブセットを、既知の遺伝子CHSおよびDFRでスクリーニングしたところ、どちらの遺伝子のクローンも濃縮前の10倍以上に頻度が増加していた。すなわち、濃縮前のライブラリー10,000クローンをCHSおよびDFRでスクリーニングしても、それぞれ2および0クローンしか選抜できなかったのに対し、濃縮後のライブラリーを用いると、1,000クローンからそれぞれ4および1クローンが得られた。

【0008】(4)P-450型酵素をコードするクローンの取得上記のようにして得たファージ・クローンをプラスミドにサブクローニングするためには、一般的には、ファージDNAを常法に従って精製した後、二本鎖cDNAのクローニングに用いた制限酵素と同じ酵素で挿入cDNAを切り出し、同一の酵素で切ったプラスミド(たとえばBluescript)にサブクローニングする。„ZAP II”の場合には、業者の操作説明書に従って直接サブクローニングされたプラスミドを得ることもできる。また、プローブとして用いるため、あるいは大きさを確認するためなどの目的で挿入cDNAを簡便に得るには、クローニング・サイト外側のベクターDNAに対応するプライマー、たとえばユニバーサルおよびリ



パース・プライマーを組み合わせ、ポリメラーゼ・チェーン・リアクション(PCR)を行ってもよい。この場合PCRの反応条件等は業者(Cetus 社)の操作説明書に従えばよい。得られたcDNAの相互関係を、クローン間の交差ハイブリッド検定や適当な制限酵素による切断パターンの比較によって調べ、別々のmRNAに対応すると考えられるcDNAクローンを選び出す。このようにして別々の遺伝子に由来すると推定されたDNA断片が、植物体中でどのように発現しているかを調べるのには、誘導前後のナスの胚軸あるいは別の植物、たとえばペチュニアの花、から得たmRNAを用いて、これらのcDNAをプローブとして常法に従ってノーザン分析を行えばよい。以上のようにして選択したクローンの塩基配列を常法に従って解析し、得られた塩基配列あるいはそれによってコードされたアミノ酸配列を、GENETYX 等のデータベース解析ソフトで公知のP-450型酵素の配列と比較したところ、得られたクローンの一つpC152 がコードしていると推測されるアミノ酸配列が、前記したアボカド果実のP-450型酵素[Bozak, K.R. et al., Proc. Natl. Acad. Sci., 87, 3904-3908 (1990)]やニワトリのステロイド 17  $\beta$ -モノオキシゲナーゼなど種々のP-450型酵素と有意な相同性を示した(図8)。しかし、それらの遺伝子のアミノ酸配列との比較から、pC152 には5'側が欠けていることがわかったので、cDNAライブラリーのファージDNAを鋳型として、pC152 の内部配列の一部とベクター上の配列を両端のプライマーとするPCRを行い、約400bp のDNAを得た。このDNAの3'端の配列とpC152 の5'端配列は完全に一致し、両者にまたがって513 アミノ酸残基のポリペプチドをコードする1,542 塩基からなるオープンリーディングフレームが見いだされた。したがって両者を結合して得られたプラスミドpC152Nは、このP-450型酵素と思われるタンパク質の全構造遺伝子を含んでいると考えられる。このような全長クローンは、pC152 をプローブとしてライブラリー自体をスクリーニングし直しても得られる。pC152Nの全塩基配列を配列表配列番号2に、それから予想されるアミノ酸配列を配列番号1に示す。

【0009】(5)フラボノイド 3',5'-水酸化酵素cDNAの同定このpC152Nの発現パターンを以下のようにして調べた。まず、ナスの実生から取得したmRNAに対し、pC152Nをプローブとするノーザン解析を行った(図6)。pC152 とハイブリダイズする約1,800 塩基のmRNAが、赤色光下で育成したナス実生には検出されず、白色光照射後初めて検出されること、および実生の中では、子葉でなく胚軸に局在することが示された。この白色光誘導性と胚軸局在性は、(1)に前記したように、CHSおよびDFRの発現パターンに共通する特徴である(図4、6)。次に、発育ステージの異なる3段階のペチュニア青花品種のつぼみあるいは葉からmRNAを取得してノーザン解析すると、つぼみのmRNAからpC152 とハイブリダイズする約2,000 塩基のバンドが検出された(図7R>7)。これはペチュニアにもナス由来のpC152 クローンに相同の遺伝子が存在することを示している。しかしこのペチュニアに存在するpC152 に相同な遺伝子のmRNAは、ナスのpC152 mRNAとは大きさが異なり、またハイブリダイゼーションの強さから、pC152 との相同性は中程度であると推定された。つぼみの発育ステージ別では中期で最大であり、その増減パターンは他のフラボノイド合成系の遺伝子、CHS、DFRおよびカルコンフラボノイドイソメラーゼ(CFI)と、良く一致していた。pC152NとハイブリダイズするmRNAはペチュニアの葉では検出できず、このmRNAがペチュニアにおいても色素を生産している組織に局在していることを示している。以上の発現パターンはこのpC152Nクローンがコードしているタンパク質がアントシアニジンの合成に関わっていることを強く示唆している。ところで、ペチュニアは古くから遺伝学的な研究材料とされ、多数の変異株が知られており[Sink, K.C., "Petunia", pp. 34-76, Springer-Verlag, Berlin Heidelberg (1984)], その中には、花色を支配している遺伝子の変異体も多数集められている。そこでフラボノイド水酸化能を欠失している変異株と青色花を有する野生株から花のつぼみからmRNAを抽出し、pC152Nをプローブとしてノーザン解析を行った。野生株では、上記した通り約2,000 塩基のバンドが検出されたが、F3',5' Hが欠損した変異株系統では、pC152 にハイブリダイズするmRNAは検出できなかった。アントシアニン合成系に関与する酵素群の中で、生化学的にP-450型酵素とされているのはケイ皮酸 4-水酸化酵素(C4H)、フラボノイド 3'-水酸化酵素(F3'H)、およびF3',5' Hの3つである[Forkmann, G., Plant Breeding, 106, 1-26 (1991)]。この中でC4Hはより上流のフェニルプロパノイド合成系の酵素である。(2)に述べたように、フェニルプロパノイド合成系の遺伝子群は、本発明によるナス胚軸を用いた白色光誘導系では明確な発現誘導がかからないので、本発明の遺伝子取得方法ではクローニングされる可能性が低い。さらに上記したペチュニア変異株のノーザン解析実験で用いたF3',5' H欠損変異株は、C4Hについては正常な株であるので、pC152NがコードしているP-450型酵素はC4Hではない。また、このペチュニア変異株はF3'Hについても正常であることがわかっている。したがって、上記の結果より、pC152NはF3',5' HをコードするcDNAクローンであると考えられる。

【0010】(6)結論以上(2)~(5)をまとめると、以下の通りである。

■pC152Nに対応するmRNAは、白色光によりナス胚軸に強く発現誘導されるが、誘導前には存在しない。この発現誘導のパターンはアントシアニン合成系のCHS、CFIおよびDFRと同じであり、フェニルプロパノイド合成系のPALおよび4-CLとは異なる。ペチュニアのつぼみにおいても、pC152Nに対応する、ナスのものより少し分子量が大きいmRNAが検出された。このmRNAの発現は、アントシアニン合成系遺伝子の発現パターンと同じく、つぼみの発育段階の中期に最大となった。以上のようにpC152Nがコードする遺伝子の発現様式は、PAL、4-CL等のフェニルプロパノイド合成系の遺伝子よりも、CHS、DFR等のアントシアニン合成系の遺伝子に類似しており、この遺伝子がC4Hではなくアントシアニン合成系の遺伝子であることを強く示唆する。

■pC152Nは配列番号2に示すような塩基配列を持っており、そこから推定されるアミノ酸配列(配列番号1)は典型的なP-450型の水酸化酵素の配列と判断される。

■フラボノイドF3',5' Hの活性は、赤色光下で育成したナス胚軸には検出されず、白色光誘導をかけた後で初めて検出される。ナス胚軸にF3'Hが存在するかどうかは知られていない。

■C4HおよびF3'Hは正常だが、F3',5' Hは欠損しているペチュニア変異株のつぼみのmRNAからは、pC152Nに対応するmRNAが検出されなかった。これはpC152Nのコードする遺伝子がF3',5' Hであることを強く示唆する。

■以上のことから、pC152Nは、デルフィニジン合成の際のキー酵素であるフラボノイド 3',5'-水酸化酵素をコードしていると結論される。

【0011】自然界には多様な基質に対応して多数のP-450型酵素が存在しており[Nebert et al., *Ann. Rev. Biochem.*, 56, 945-993 (1987)]、それらの断片を用いたり、異なるP-450型酵素の断片を組み合わせると融合タンパク質を作ったりすると、酵素活性が著しく変化する可能性が示されている。たとえば酵母のP-450型酵素であるP-450 P1のN端側2/3とP-450 LM4のC端側1/3とを融合させると、両者のいずれよりもはるかに活性が高まることが示された[Pompon et al., *Gene*, 83, 15-24 (1989)]。また、P-450型酵素が触媒する酸化反応では、P-450還元酵素から電子が供給される場合が多いが、そのような場合にP-450型酵素と対応するP-450還元酵素とを融合させると、P-450型酵素の活性が2倍以上に高まることも知られている[Shibata, et al., *DNA Cell Biol.*, 9, 27-36 (1990)]。したがって、本発明のF3',5' HをコードするDNA鎖においても、その任意の断片を、単独であるいは融合タンパク質をコードするDNA鎖の一部として利用することは明らかであろう。また、一般にあるDNA鎖があるアミノ酸配列を持つポリペプチドをコードする場合、ひとつのアミノ酸に対応する遺伝コード(コドン)が複数存在するために、ひとつのアミノ酸配列に対応するDNA鎖が複数個存在する(縮重異性体)。本発明のF3',5' HをコードするDNA鎖においても、それがコードするポリペプチドのアミノ酸配列を変化させない範囲において、任意の遺伝コードを用いることができることはいうまでもない。さらに、F3',5' Hあるいはその任意の断片に種々のアミノ酸置換、欠損、付加、挿入が加わった変異ポリペプチドであっても、F3',5' H活性を保持している限り、本発明の目的に用いることができる。本発明の好ましい態様において、コードされる「フラボノイド 3',5'-水酸化酵素活性を持つタンパク質のアミノ酸配列が実質的に配列番号1に示すものである」という場合の「実質的」という用語は、本発明DNA鎖が自然界に存在するF3',5' H活性を持つタンパク質をコードするDNA鎖だけでなく、このような変異水酸化酵素ポリペプチドをコードするDNA鎖をも包含することを意味する。また、DNA鎖またはその断片を発現させてそれがコードするタンパク質もしくはポリペプチドを産生させるためには、そのアミノ酸配列に対応するDNA配列(コーディング領域)以外に、発現調節配列が必要である。したがって本発明DNA鎖は、このような発現調節配列を含むDNA配列をも包含するものである。この発現調節配列の中で特に重要なものは、コーディング領域上流のプロモーター配列および下流のポリA付加シグナル配列である。プロモーターおよびポリA付加シグナルとしては、植物中で機能することが知られている公知のもの、例えばカリフラワーモザイクウィルス35Sプロモーター、ノパリン合成酵素のプロモーター、リブ羅斯ニリン酸カルボキシラーゼ/オキシゲナーゼ小サブユニットのプロモーター、およびノパリン合成酵素のポリA付加シグナル、オクトピン合成酵素のポリA付加シグナル、などを適宜組合わせて用いることができる。得られたDNA配列がcDNAである場合には、F3',5' Hを宿主中で発現させるために、cDNAの上流および下流に前記の発現調節配列を連結することが必要である。取得したDNA配列がゲノム遺伝子である場合には、DNA配列に発現調節配列が含まれていればそれをそのまま用いることもできる。本発明は、上述のDNA鎖またはその断片を含む組換えベクターにも関するものであることは前記したところである。この組換えベクターは上述のDNA鎖またはその断片をベクターに連結させたものであり、ベクターとしてはプラスミド、ファージあるいはコスミドなど公知のものが使用できる。この組換えベクターDNAを適当な植物(たとえばバラ、キウ、ナデシコ、チューリップなど)、微生物(たとえば酵母など)細胞などの宿主に導入し

て発現させることにより、宿主中においてF3',5' Hが産生される。

【0012】

【実施例】以下実施例を挙げて、本発明をさらに詳細に説明するが、本発明は、これらの実施例によって限定されるものではない。

**実施例1** フラボノイド系色素の誘導ナス種子(東北種苗社の品種"新佐土原茄子")をバーミキュライトに播種し、赤色のアクリル板(メイバン社製、厚さ1mm)を通して得た300 ルックスの赤色光を連続照射して25℃、2週間栽培した。次に、8000ルックスの白色の蛍光灯(東芝社、実生の位置で6W/m<sup>2</sup>)および紫外光(東芝社、FL-20S E、FL-20SBLB;0.5W/m<sup>2</sup>) [この条件を本発明では白色光と呼ぶ]を5日間照射した。植物体から、光源までの距離は、15~25cmであった。白色光照射後、アントシアン含量を測定するため、定時的に0.2 g の実生を1%のメタノール塩酸で抽出し、540nm の吸光度を測定した。5日目の色素量を最大とした時2日目で既に最大値の半分に達していた(図3R>3)。並行して、チャージウインの方法[Chirgwin, J.M. et al., Biochemistry, 18, 5294-5299 (1979)]に従って実生の各部分からmRNA抽出を行い、ホルムアルデヒド入りの変性下でアガロース電気泳動後、ナイロン膜(Hybond N; Amersham社)に業者の説明書に従って転写した。ペチュニア花弁のカルコン合成酵素(CHS)およびジヒドロフラボノール-4-レダクターゼ(DFR)、ならびにタバコの葉のリブロース-1,5-2リン酸カルボキシラーゼ・オキシゲナーゼ小サブユニットの全構造遺伝子を、それぞれの公知の塩基配列[Koes et al., Gene, 81, 245-257 (1989); Beld et al., Plant Mol. Biol., 13, 491-502 (1989); Mazur et al., Nucl. Acids Res., 13, 2373-2386 (1985)]を利用してPCR法によりクローニングした。PCRの条件はCetus社の説明書の指示に従った。得られた各遺伝子をプローブとして、ナスのmRNAのノーザン・ブロットに対してハイブリダイゼーションを行った。ハイブリダイゼーションは5×SSPE[1×SSPEは10mM リン酸緩衝液(pH 7.0)、1mM EDTA、0.15M NaCl]、0.2% SDS、100 μg/ml ニシン精子DNA、100 μg/ml 酵母RNAから成る液中で60℃、16時間行い、その後膜を2×SSC [1×SSC は0.15M NaCl、15mM クエン酸ナトリウム]液中で室温、15分×2回、次いで0.1×SSC 液中で60℃、15分×2回洗った。オートラジオグラフィの結果を図4に示す。

【0013】**実施例2** フラボノイド合成に関与する遺伝子が濃縮されたcDNAライブラリーの作製実施例1に従って、赤色光のもとで2週間栽培した後白色光による誘導を72時間かけたナス実生を材料として使用した。実施例1と同様にしてmRNAを調製し、Stratagene社のcDNA合成キット(„ZAP II クローニングキット)を用い、業者の使用説明書に従って二本鎖cDNAを合成して„ZAP II のEcoRI/XhoIサイトにクローニングし、cDNAライブラリーを作製した。一方白色光誘導をかける前および後のナス実生からmRNAを抽出し、各mRNA100ngを60倍量のoligo(dT)プライマーとアニールさせた後、20 „M dCTP、300 „Ci <sup>32</sup>P-dCTP (3000 Ci/mmol; Amersham社)、各200 „M のdGTP/dATP/dTTP、20mM DTT、50mM Tris-HCl (pH 7.5)、75mM KCl、3mM MgCl<sub>2</sub>の存在下で1 „l のMMLV逆転写酵素(100U/ „l; BRL社)と37℃、1時間反応させてそれぞれのmRNAに対する<sup>32</sup>PでラベルしたcDNAプローブを作製し、ディファレンシャル・スクリーニングに用いた。また、このようにして作成した白色光誘導後のcDNAから、以下のようにしてサブトラクト・プローブを作製した。Invitrogen社のキットを用いて、使用説明書に従って白色光誘導前のナス実生由来のmRNAをピオチン化した。<sup>32</sup>Pラベルした誘導後cDNAと20倍量のピオチン化した誘導前mRNAとを、20 „lの0.2% SDS、50mM Hepes (pH7.6)、0.5M NaCl、2mM EDTA、50%(V/V)ホルムアミドを含む液[Crowell, D.N. et al., Proc. Natl. Acad. Sci., 87, 8815-8819 (1990)]中で40℃、40時間ハイブリダイズさせた。反応終了後この液に80 „lの50mM Hepes (pH7.6)、0.5M NaCl、2mM EDTAおよび10 „g ストレプトアビジン(Vector社)の混合液を加え、室温で10分間反応後、100 „lのフェノール/クロロホルム混液で抽出し、上層を回収してサブトラクト・プローブとして用いた。常法に従って、寒天培地上にまいたファージ・ライブラリーを3枚のHybond Nナイロン膜に移した。これらの膜を上記した白色光誘導前または後のcDNAプローブあるいはサブトラクト・プローブを用いてスクリーニングし、陽性クローンを選抜した。ハイブリダイゼーションは5×SSPE、0.2% SDS、100 „g/mlニシン精子DNA、100 „g/ml 酵母RNAから成る液中で65℃、16時間行い、その後膜を2×SSC 液中で室温、15分×2回、次いで0.1×SSC 液中で65℃、15分×2回洗った。この実験結果の例を図5に示した。誘導前または誘導後のcDNAプローブを直接使用して比較した場合(ディファレンシャル・スクリーニング)に比べて、サブトラクト・プローブを使うことによりはるかにシグナル・ノイズの比率が高くなっていることがわかる。

【0014】**実施例3** P-450型酵素をコードするクローンの取得と構造解析実施例2の方法により

30,000クローンを繰り返しスクリーニングすることにより、70クローンの白色光誘導性クローンから成るライブラリー・サブセットを得た。選抜されたファージ・クローンから、„ZAP IIの使用説明書に従ってcDNA断片をプラスミドBluescriptにサブクローニングした。得られたクローン同士の重複を制限酵素マッピングおよびドット・ハイブリダイゼーションによりチェックし、独立と考えられたクローンから無作為に10クローンを抽出して、サンガー法に従って塩基配列を解析した。得られた塩基配列上に見いだされたオープンリーディングフレームにコードされていたアミノ酸配列を、GENETYX データベース解析ソフト(ソフトウェア開発社)を用いて公知のタンパク質アミノ酸配列データベース(NBRF-PDB, Rel. 27)と比較したところ、10クローンのうちの1つ、pC152 上のオープンリーディングフレームにコードされていた425 アミノ酸から成るポリペプチドが、20種のP-450型酵素またはその断片と相同性を示した。このクローンがコードするポリペプチドとある程度の相同性を示した公知タンパク質はすべてP-450型酵素またはその断片であった。そのうちの一つ、ニワトリのステロイド 17 „-モノオキシゲナーゼとpC152 にコードされたポリペプチドとの比較を図8に示す。またこのポリペプチドは前記したアボカド果実のP-450型酵素[Bozak, K.R. et al., Proc. Natl. Acad. Sci., 87, 3904-3908 (1990)]にも有意な相同性を示した。図8から明らかかなように、pC152 上に見いだされたオープンリーディングフレームは5'側が不完全であると推定されたので、pC152 の塩基配列の一部(配列番号2に示した塩基配列の塩基番号378 から397 の20塩基)に相補的な合成オリゴDNAとBluescriptシークエンス用T3プライマー(Promega 社)とを用いてPCRを行った。この合成プライマー配列は、pC152 上のcDNA断片の5'端から約100bp のところに位置し、その内部に制限酵素NdeIの認識配列を含んでいる。プライマー各0.2 „M、ファージ・ライブラリーDNA100ng、10倍濃度の緩衝液(Cetus 社キットに含まれたもの)、0.2mM 4dNTPs、2.5U Ampli Taq ポリメラーゼ(Cetus社)、および100 „lのミネラル・オイルから成る反応液中で、95°C(1分)、55°C(1分)および72°C(2分)の反応サイクルを25回行った。生成物を等量のクロロホルムで抽出後、水層を回収しエタノール沈澱を行った。得られた約400bp のDNAを制限酵素BamHI(ベクターBluescript上に認識配列がある)とNdeIで切断後、同様に切断したpC152 のBamHI サイトとNdeIサイトの間にクローニングした。常法に従ってPCR断片部分の塩基配列を解析し、pC152 上のcDNA断片と重複する部分を比較したところ、両者は完全に一致していた。またPCR断片に由来する配列中には、pC152 上のオープンリーディングフレームと読み枠が合った翻訳開始コドン(ATG)が見いだされた。したがって、このようにして得られたプラスミドpC152Nは、完全長のオープンリーディングフレームを含んでいると結論された。pC152N 上のcDNA断片1696bpの全塩基配列およびそれがコードする513 アミノ酸のポリペプチドの全アミノ酸配列を、配列表の配列番号2、1にそれぞれ示す。ニワトリのステロイド 17 „-モノオキシゲナーゼは503 アミノ酸から成っており、pC152Nにコードされたタンパク質の大きさはこれとよく一致している。

**【0015】実施例4** pC152Nにコードされた遺伝子の発現パターンの分析このpC152Nにコードされたタンパク質の発現パターンを以下のようにして調べた。白色光誘導をかける前および後のナス実生の胚軸、およびアボカド果実から実施例1と同様にしてmRNAを抽出し、pC152Nの3'側断片(ApaIサイト(配列番号2の塩基番号992)より3'側全体;以下pC152-ApaIと呼ぶ)をプローブとして、ノーザン・ハイブリダイゼーションを行った。ハイブリダイゼーションは5 × SSPE、0.2 % SDS、100 „g/ml ニシン精子DNA、100 „g/ml 酵母RNAから成る液中で65°C、16時間行い、その後膜を2 × SSC 液中で室温、15分 × 2回、次いで0.1 × SSC 液中で65°C、15分 × 2回洗った(以下の実施例のノーザン・ハイブリダイゼーションはハイブリダイゼーションと洗いの温度を適宜変えた以外は、すべてこの条件で行った)。結果を図6aに示す。白色光誘導をかけたナス胚軸でのみ、1.8kb の強いシグナルが得られた。次に白色光誘導後のナス実生の胚軸および子葉から同様にmRNAを抽出し、pC152-ApaIあるいは実施例1で得たペチュニア由来のCHSおよびDFR構造遺伝子をプローブとしてノーザン・ハイブリダイゼーションを行った。ハイブリダイゼーションの条件は、pC152-ApaIをプローブとした場合は上記と同じ条件、ペチュニアの遺伝子をプローブとした場合には温度を60°Cに下げて行った。結果を図6bに示す。いずれのプローブを使った場合でも、胚軸でのみシグナルが得られ、pC152Nにコードされたタンパク質とCHS、DFRのナス実生での発現パターンはよく似ていることがわかった。さらに、青色の花をつけるペチュニア品種(“青い星”;サカタのタネ社)を生育させ、つぼみを経時的に得た。つぼみの発育ステージの分類は、つぼみの長さが最大長の約20%のものを初期、40%のものを中期、80%のものを後期とした。それぞれのステージのつぼみ、および若い葉から、実施例1と同様にしてmRNAを抽出し、pC152-ApaIあるいはペチュニア花弁由来のCHS、DFR(実施例1)およびカルコンフラバノニソメラーゼ(CFI)構造遺伝子(実施例1と同様にして公知の塩基配列[Tunen et al., EMBO J., 7, 1257-1263 (1988)]を利用して



PCRでクローニングしたもの)をプローブとしてノーザンハイブリダイゼーションを行った。ハイブリダイゼーションの温度は、pC152-ApaIをプローブとした場合は60°C、ペチュニアの遺伝子をプローブとした場合には65°Cとした。結果を図7に示す。pC152-ApaIをプローブとした場合、青花のペチュニアのつぼみでは約2kbのシグナルが得られた。この2kbmRNAの発現量は、つぼみの発育ステージに応じて変化し中期で最も発現量が多くなったが、この変化のパターンはCHS、DFR、CFIの発現量の変化と一致していた。またこの2kbmRNAは、DFRと同じく、ペチュニアの葉では検出されなかった。これらの結果は、pC152Nにコードされた遺伝子と相同の遺伝子が青花のペチュニアに存在し、その発現パターンはCHS、DFR、CFI遺伝子とよく似ていることを示す。ハイブリダイゼーションの温度を変えたときのシグナル強度の変化から、ペチュニアのpC152Nとハイブリダイズする遺伝子とpC152Nにコードされた遺伝子との相同性は中程度であると推定された。最後に、ペチュニアの野生株V6と変異株R3およびW39 [以上はオランダ・フリー(Vrij)大学のモル(J.N.M.Mol)教授より分譲を受けた。]および上記の実験に用いた品種”青い星”(サカタのタネ社)のつぼみ、およびコントロールとして白色光誘導をかけたナス胚軸から、実施例1と同様にしてmRNAを抽出し、pC152-ApaIをプローブとして60°Cでノーザン・ハイブリダイゼーションを行った。R3およびW39株は、いずれもC4HおよびF3',5'Hは正常だがF3',5'Hを欠損した変異株である。その結果、ナスの胚軸およびペチュニアのV6株と”青い星”(いずれもデルフィニジン系色素を産生する株)では上記の各実験と同様に1.8kbまたは2kbのシグナルが検出されたが、F3',5'Hを欠損した変異株R3およびW39株ではpC152Nとハイブリダイズするシグナルは検出されなかった。この結果はpC152Nにコードされている遺伝子がフラボノイド 3',5'-水酸化酵素遺伝子であることを示している。

#### 【0016】

【発明の効果】本発明により、植物の花弁等の主要な青色色素デルフィニジンの生合成におけるキー酵素、フラボノイド 3',5'-水酸化酵素をコードするDNA鎖が提供された。デルフィニジンを持たない植物、たとえばバラ、キク、ナデシコ、チューリップなどは、シアニジンやペラルゴニジンは合成できるが、フラボノイド 3',5'-水酸化酵素を欠くためにデルフィニジンが合成できない。したがって、本発明のDNA鎖を公知の方法に従って目的植物に導入すれば、花色等の色彩の多様性、特に、青色系の色彩の創出に大きく役立つ。

#### 【0017】

【配列表】配列番号:1配列の長さ:513配列の型:アミノ酸トポロジー:直鎖状配列の種類:タンパク質起源:生物名:ナス(Solanum melongena)株名:新砂土原茄子配列 Met Val Ile Leu Pro Ser Glu Leu Ile Gly Ala Thr Ile Ile Tyr Ile 1 5 10 15 Ile Val Tyr Ile Ile Ile Gln Lys Leu Ile Ala Thr Gly Ser Trp Arg 20 25 30 Arg Arg Arg Leu Pro Pro Gly Pro Glu Gly Trp Pro Val Ile Gly Ala 35 40 45 Leu Pro Leu Leu Gly Gly Met Pro His Val Ala Leu Ala Lys Met Ala 50 55 60 Lys Lys Tyr Gly Pro Ile Met Tyr Leu Lys Val Gly Thr Cys Gly Met 65 70 75 80 Val Val Ala Ser Thr Pro Asn Ala Ala Lys Ala Phe Leu Lys Thr Leu 85 90 95 Asp Ile Asn Phe Ser Asn Arg Pro Pro Asn Ala Gly Ala Thr His Met 100 105 110 Ala Tyr Asn Ala Gln Asp Met Val Phe Ala Pro Tyr Gly Pro Arg Trp 115 120 125 Lys Leu Leu Arg Lys Leu Ser Asn Leu His Met Leu Gly Gly Lys Ala 130 135 140 Leu Glu Asn Trp Ala Asn Val Arg Ala Asn Glu Leu Gly His Met Leu 145 150 155 160 Lys Ser Met Phe Asp Ala Ser His Val Gly Glu Arg Ile Val Val Ala 165 170 175 Asp Met Leu Thr Phe Ala Met Ala Asn Met Ile Gly Gln Val Met Leu 180 185 190 Ser Lys Arg Val Phe Val Glu Lys Gly Lys Glu Val Asn Glu Phe Lys 195 200 205 Asn Met Val Val Glu Leu Met Thr Val Ala Gly Tyr Phe Asn Ile Gly 210 215 220 Asp Phe Ile Pro Gln Ile Ala Trp Met Asp Leu Gln Gly Ile Glu Lys 225 230 235 240 Gly Met Lys Lys Leu His Lys Lys Phe Asp Asp Leu Leu Thr Lys Met 245 250 255 Phe Glu Glu His Glu Ala Thr Ser Asn Glu Arg Lys Gly Lys Pro Asp 260 265 270 Phe Leu Asp Phe Ile Met Ala Asn Arg Asp Asn Ser Glu Gly Glu Arg 275 280 285 Leu Ser Ile Thr Asn Ile Lys Ala Leu Leu Leu Asn Leu Phe Thr Ala 290 295 300 Gly Thr Asp Thr Ser Ser Ser Val Ile Glu Trp Ala Leu Thr Glu Met 305 310 315 320 Met Lys Asn Pro Thr Ile Phe Lys Lys Ala Gln Gln Glu Met Asp Gln 325 330 335 Ile Ile Gly Lys Asn Arg Arg Phe Ile Glu Ser Asp Ile Pro Asn Leu 340 345 350 Pro Tyr Leu Arg Ala Ile Cys Lys Glu Ala Phe Arg Lys His Pro Ser 355 360 365 Thr Pro Leu Asn Leu Pro Arg Val Ser Ser Asp Ala Cys Thr Ile Asp 370 375 380 Gly Tyr Tyr Ile Pro Lys Asn Thr Arg Leu Ser Val Asn Ile Trp Ala 385 390 395 400 Ile Gly Arg Asp Pro Asp Val Trp Glu Asn Pro Leu Glu Phe Ile Pro 405 410 415 Glu Arg Phe Leu Ser Glu Lys Asn Ala Lys Ile Glu His Arg Gly Asn 420 425 430 Asp Phe Glu Leu Ile Pro Phe Gly Ala Gly Arg Arg Ile Cys Ala Gly 435 440 445 Thr Arg Met Gly Ile Val Met Val Glu Tyr Ile Leu Gly Thr Leu Ile 450 455 460 His Ser Phe Asp Trp Lys Leu Pro Asn Asp Val

Val Asp Ile Asn Met 465 470 475 480 Glu Glu Thr Phe Gly Leu Ala Leu Gln Lys Ala Val Pro Leu  
 Glu Ala 485 490 495 Ile Val Thr Pro Arg Leu Ser Phe Asp Ile Tyr Gln Ser Ser Glu Pro 500 505  
 510 Phe 【0018】配列番号:2配列の長さ:1696配列の型:核酸鎖の数:二本鎖トポロジー:直鎖  
 状配列の種類:cDNA to mRNA起源:生物名:ナス (*Solanum melongena*)株名:新砂土原茄子配列  
 の特徴:特徴を表す記号:CDS存在位置:49..1590特徴を決定した方法:P配列ATAAACTTTA  
 TATTATAATT TATACATTTT TGATATTATT ATATTATCAT GGTTATACTT 60 CCTAGTGAGT  
 TGATTGGAGC AACTATTATA TATATCATAG TATATATTAT TATTCAAAAA 120  
 TTAATAGCCA CCGGCAGCTG GCGGAGGCGG CGGCTGCCGC CAGGTCCGGA  
 GGGGTGGCCG 180 GTGATCGGAG CACTACCACT TTTAGGTGGC ATGCCACATG  
 TTGCACTTGC AAAAATGGCC 240 AAAAAATATG GACCTATTAT GTATTTAAAA  
 GTTGGCACTT GTGGGATGGT TGTTGCTTCA 300 ACTCCTAATG CTGCAAAAGC  
 TTTCTTGAAA ACACTTGATA TTAATTTCTC CAATCGTCCA 360 CCTAATGCAG  
 GTGCCACACA TATGGCCTAT AATGCCCAAG ACATGGTTTT TGCACCCTAT 420  
 GGACCTCGTT GGAAGTTGCT AAGGAAATTG AGCAACTTAC ACATGCTAGG TGGAAAAGCC  
 480 TTAGAAAATT GGGCCAATGT CCGGGCCAAT GAGCTAGGTC ACATGCTAAA  
 ATCGATGTTT 540 GACGCGAGCC ATGTGGGTGA ACGCATAGTC GTGGCCGATA  
 TGTTGACGTT CGCGATGGCA 600 AACATGATAG GTCAAGTGAT GTTAAGCAAG  
 AGAGTGTTTC TCGAAAAGG TAAAGAGGTC 660 AACGAATTCA AAAATATGGT  
 CGTGGAAGT ATGACAGTTG CCGGGTACTT TAATATTGGC 720 GATTTTATTC  
 CTCAAATAGC TTGGATGGAT TTACAAGGAA TTGAAAAGGG GATGAAAAAA 780  
 TTGCACAAAA AATTTGATGA TTTATTGACA AAAATGTTTG AGGAGCATGA GGCAACTAGC  
 840 AATGAAAGAA AAGGGAAACC TGATTTTCTT GATTTTATTA TGGCAAATAG  
 GGATAATTCT 900 GAAGGAGAAA GGCTTAGTAT AACAAATATC AAAGCACTTT  
 TACTGAATTT GTTCACAGCT 960 GGTACAGACA CCTCATCTAG CGTGATAGAA  
 TGGGCCCTCA CAGAAATGAT GAAAAATCCC 1020 ACAATTTTCA AAAAAGCCCA  
 ACAAGAAATG GACCAAATAA TTGGCAAAAA TAGACGTTTT 1080 ATTGAATCTG  
 ATATCCCAA TCTCCCTTAT TTACGTGCAA TTTGCAAAGA AGCATTTTCA 1140  
 AAACACCCTT CAACGCCACT AAATCTTCCT AGGGTGTCAA GTGATGCGTG CACGATCGAT  
 1200 GGTTACTATA TACCAAAAAA CACTAGGCTC AGCGTCAATA TATGGGCGAT  
 TGGACGAGAC 1260 CCTGACGTGT GGGAGAATCC TCTCGAATTC ATTCCCGAGA  
 GGTTTTTGAG TGAGAAAAAT 1320 GCAAAGATTG AGCATCGAGG AAATGATTTT  
 GAATTGATTC CATTTGGTGC AGGACGAAGA 1380 ATTTGTGCCG GCACAAGGAT  
 GGGAATAGTG ATGGTTGAGT ATATATTGGG AACTTTGATA 1440 CATTCAATTTG  
 ATTGGAAATT ACCAAATGAT GTTGTTGATA TAAATATGGA GGAACTTTT 1500  
 GGATTAGCTT TGCAAAAAGC TGTCCCTCTT GAAGCTATAG TTAATCCAAG GCTATCTTTC  
 1560 GATATTTATC AGTCTAGCGA GCCTTTCTGA TCATCTACAT TGTAACGTAT  
 TTGTTGAAGA 1620 CTTTAACAAA AGAAACTCG CTTTATATAT GAAAACTGA  
 TAATGTCATA TCTCGGAGGA 1680 TTTTATTTTG TAAAAA 1696

#### 【図面の簡単な説明】

【図1】フラボノイドの骨格を示す図である。

【図2】フェニルプロパノイドおよびフラボノイド合成系の反応の概略図である。

【図3】白色光照射後のナス実生中のアントシアニン含量の経時変化を示す説明図である。最大値を100とした相対値で表してある。

【図4】白色光照射後のナス実生中のCHS、DFRおよびリブローズ-1,5- 2リン酸カルボキシラーゼ・オキシゲナーゼ小サブユニット(RuBisCO)のmRNA量の経時変化をノーザン・ハイブリダイゼーションによって調べた電気泳動写真である。

【図5】ナス胚軸中に白色光によって発現誘導される遺伝子をコードするクローンのスクリーニング例を示す写真である。誘導前および誘導後の組織から得たmRNAに対するcDNAプローブを用いたディファレンシャル・スクリーニング、ならびに、誘導後のmRNAに対するcDNAを大過剰の誘導前のmRNAでサブトラクトしたプローブを用いてライブラリーをスクリーニングした結果を示す。1枚のプレートから3枚のフィルターにDNAを転写し、それぞれのプローブでハイブリダイズさせた。矢じりの先は同一のクローンを示す。

【図6】(a)は、pC152Nをプローブとして、光誘導前後のナス胚軸およびアボカド果実由来のmRNAをノーザン解析した結果を示す電気泳動写真であり、(b)および(c)は、ナス実生を胚軸と子葉に分けて取ったmRNAに対し、CHS、DFRおよびpC152Nをプローブとしてノーザン解析を行った結果を示す電気泳動写真である。

【図7】CHS、CFI、DFRおよびpC152Nをプローブとして、青花ペチュニア品種のつぼみから経時的に得たmRNA、および一部のプローブについては誘導をかけたナス胚軸とペチュニアの葉から得たmRNAに対しノーザン解析を行った結果を示す電気泳動写真である。

【図8】pC152 上のオープンリーディングフレームがコードしているポリペプチドのアミノ酸配列を、ニワトリのステロイド 17  $\beta$ -モノオキシゲナーゼ(SMO)のアミノ酸配列と比較した図である。

【符号の説明】

PAL : フェニルアラニンアンモニアリアーゼ

C4H : ケイ皮酸 4-水酸化酵素

4-CL : 4-クマル酸:CoAリガーゼ

CHS : カルコン合成酵素

CFI : カルコンフラバノイソメラーゼ

F3'H : フラボノイド 3'-水酸化酵素

F3',5' H: フラボノイド 3',5'- 水酸化酵素

DFR : ジヒドロフラボノール -4-レダクターゼ

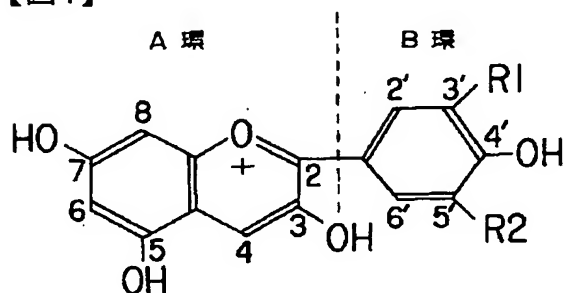
(以上は図2に関連する)

\* : 一致したアミノ酸

・ : 相似のアミノ酸

(以上は図8に関連する)

【図1】

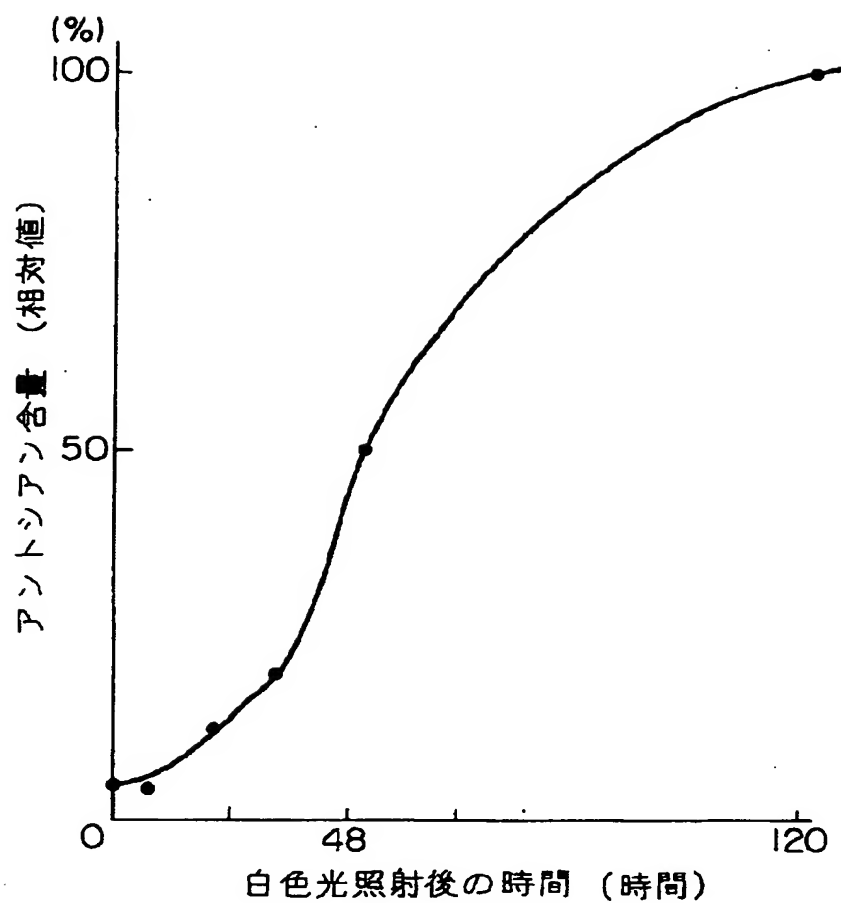


フラボノイド名	R1	R2
ペラルゴニン	H	H
シアニン	OH	H
デルフィニン	OH	OH

フラボノイドの骨格

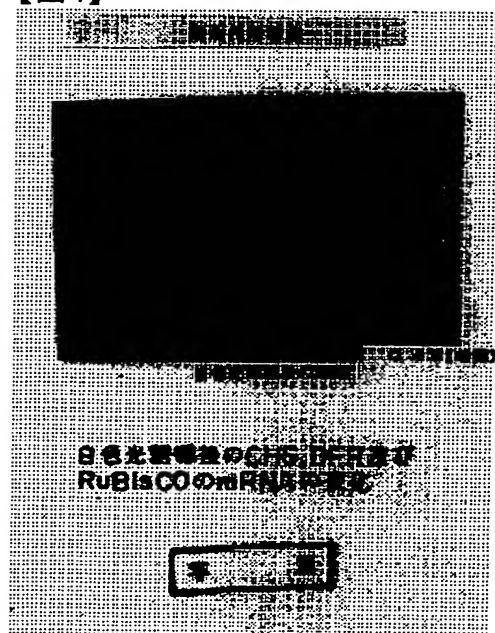
【図3】



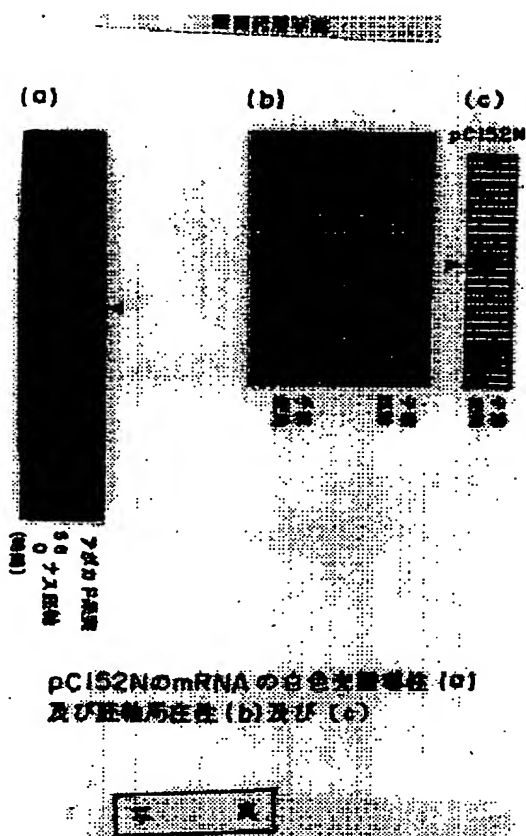


白色光誘導後のアントシアニン量の変化

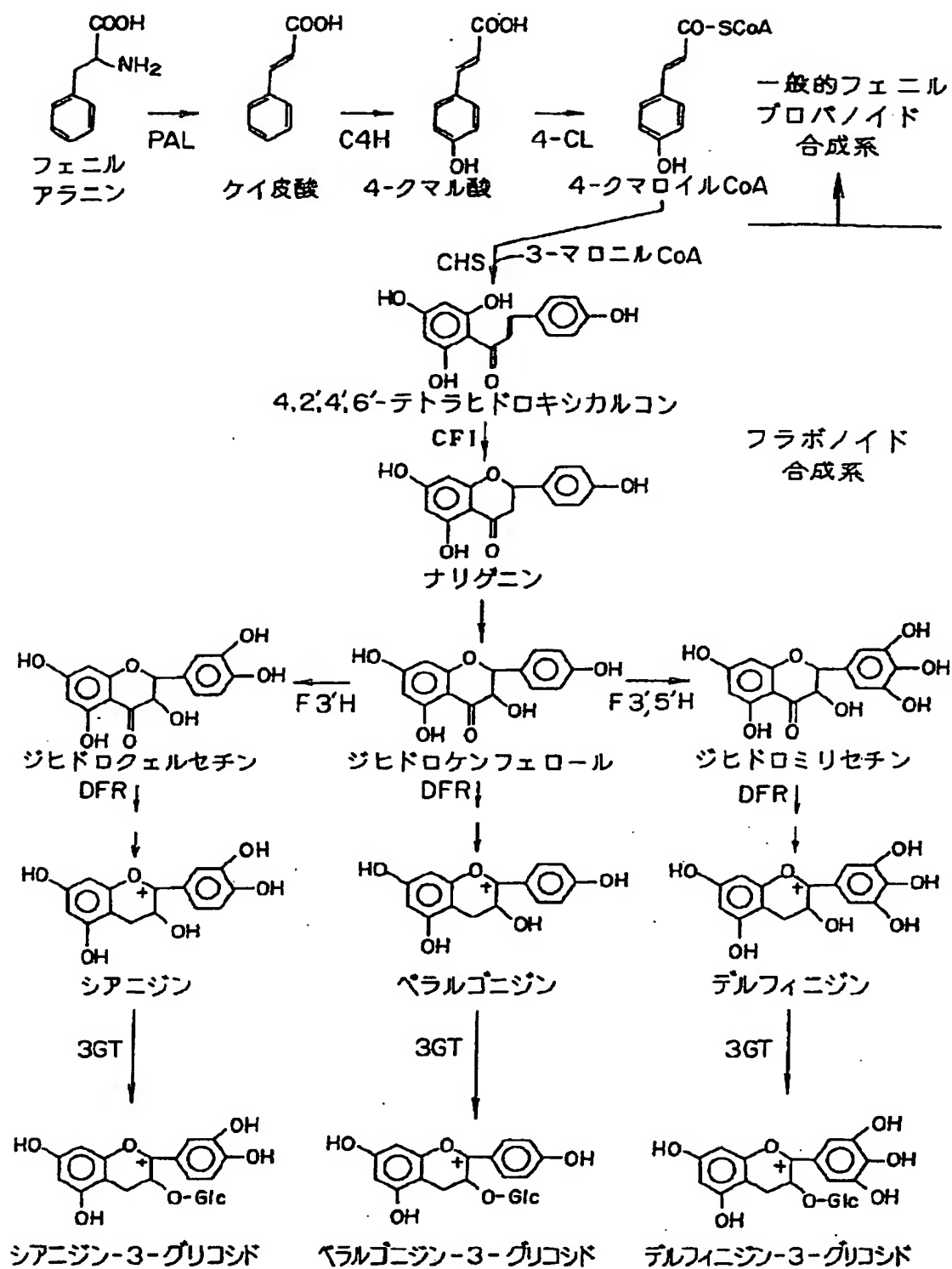
【図4】



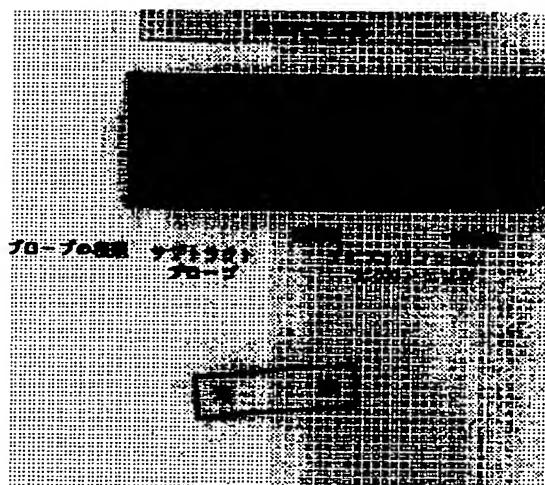
【図6】



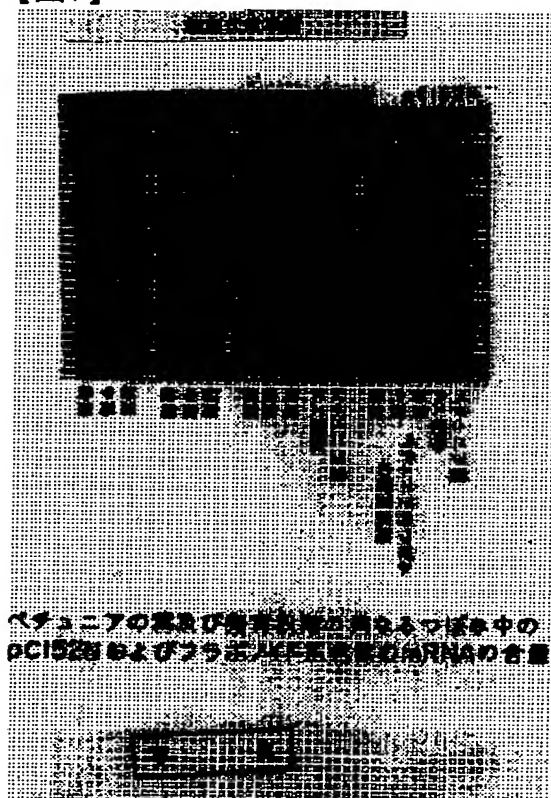
【図2】



【図5】



【図7】



【図8】

SMO MPPLAVLLLLALALLCAWRLSYSQGPTGTGTGRPRSLPALPLVGSLLQLAGHPQLHLRLWR

SMO LQGRYGSlyGLWMGSHYVVVNSYQHAREVLLKKGKAFAGRPRTVTTDLLSRGGKDIAFA  
 pC152 \*\*\*\*\*  
 AKAFKLTLDINFSNRPPNAGATHMAYNAQDMVFA

SMO SYGPLWKFORKLVAALSMFGEESV-ALEKIIICREAASLCETL--GAAQDMALDHAPELT  
 \*\*\*\*\*  
 pC152 PYGPRWKLLRKL--SNLHMLGGKALENWANVRANELGHMLKSMFDASHVGERIVVADMLT

SMO RAVTNVVCSLCFNSS-Y---RRGDPEFEAMLEYSQGIIVDTVAKESLVDIFPWLQIFPNRD  
 \*\*\*\*\*  
 pC152 FAMANMIGQVMLSkrVFVEKGKEVNEFKNMVVELMTVAGYFNIGDFIPQIAWMD-LQIE

SMO LALLKRCLKVRDQLLQKQFTEHKEAFCGDTVRDLMDALLQVRLNAENNSPLEPGLELTD  
 \*\*\*\*\*  
 pC152 KG-MKKLHKKFDDLLTKMFEEH-EA--TSNERKKGKPDFLDFIMANRDNSEGER-LSITNI

SMO HLLMTVGDI FGAGVETTTIVLKWAVLYLLHYPEVQKKIQEEMDQKIGLARHPHLSDRPLL  
 \*\*\*\*\*  
 pC152 KALL--LNLFTAGTDTSSSVIEWALTEMMKNPTIFKKAQQEMDQIIGKNRRFIESDIPNL

SMO PYLEATISEGLRIRPVSPILLIPHVSLADTSIGEYSIPKGARVVINLWSVHHDEKEWDKPE  
 \*\*\*\*\*  
 pC152 PYLRAICKEAFRKHPTPLNLPRVSSDACTIDGYIIPKNTRLVNIWAIGRDPDVWENFL

SMO EFNPRGFLOEQGQHISPSPSY--LPFGAGIRVCI,GEVLAKMELFLFLAWVLQRFTLECP  
 \*\*\*\*\*  
 pC152 EFIPERFLSEKNAKIEHRGNDFELIPFGAGRRICAGTRMGIVMVEYILGTLIHSFDWKLP

SMO QDQPLPSLEGKFGVVLQVQKFRVKARLREAWRGEMVR  
 \*\*\*\*\*  
 pC152 NDVVDINMEETFGLALQKAVPLEAIVTPRLSFDIYQSSEPF

This Page is inserted by IFW Indexing and Scanning  
Operations and is not part of the Official Record

## BEST AVAILABLE IMAGES

Defective images within this document are accurate representations of the original documents submitted by the applicant.

Defects in the images include but are not limited to the items checked:

- ☒ BLACK BORDERS
- ☒ IMAGE CUT OFF AT TOP, BOTTOM OR SIDES
- ☒ FADED TEXT OR DRAWING
- ☐ BLURED OR ILLEGIBLE TEXT OR DRAWING
- ☐ SKEWED/SLANTED IMAGES
- ☒ COLORED OR BLACK AND WHITE PHOTOGRAPHS
- ☐ GRAY SCALE DOCUMENTS
- ☐ LINES OR MARKS ON ORIGINAL DOCUMENT
- ☐ REPERENCE(S) OR EXHIBIT(S) SUBMITTED ARE POOR QUALITY
- ☐ OTHER: \_\_\_\_\_

**IMAGES ARE BEST AVAILABLE COPY.**

**As rescanning documents *will not* correct images  
problems checked, please do not report the  
problems to the IFW Image Problem Mailbox**